

Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Grau en Ciència i Producció Animal

Trabajo de Final de Grado

Identificación de marcadores moleculares en
cerdas resistentes a la infección con el virus
PRRS

Alumna: Marta Deu Banegas

Tutora: Dra. Ramona Natacha Pena i Subirà

Agradecimientos

Agradezco este trabajo a mi profesora, la Dra. Ramona Natacha Pena i Subirà por formarme y siempre estar dispuesta a ayudarme.

A mi familia y a Alex por su apoyo constante.

También a las compañeras de laboratorio Pilar y Emma por resolver todas mis dudas.

Resumen

El PRRS es actualmente la patología más importante económicamente en la producción porcina. El virus se transmite por varias vías, entre ellas la transplacentaria, provocando síntomas graves en las camadas. Hasta el momento la vacunación es la estrategia de control más utilizada, aunque tiene poco éxito en el campo. En este estudio se pretendieron identificar genes y biomarcadores asociados a caracteres de resistencia a esta infección. Los datos utilizados en este estudio se obtuvieron a partir de una población de cerdas comerciales ($n = 382$) en la que se registraron los datos reproductivos, los títulos de PRRSv en sangre y los anticuerpos en fases endémicas y en brotes de la enfermedad. Se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar las regiones del genoma porcino más relevantes en cuanto a características reproductivas e inmunes y se localizaron genes candidatos para estos caracteres (*SGK1* y *TAP1*). Se secuenció la región codificante de estos genes en un subgrupo de 32 cerdas para identificar polimorfismos segregando esta población de reproductoras. Se identificaron distintos polimorfismos y se diseñaron *primers* específicos para dichas regiones; finalmente se seleccionaron dos marcadores: SGK1_M6 y TAP1_M3. Se genotiparon los polimorfismos hallados mediante la técnica qPCR-HRM. Se utilizó el software High Resolution Melt Software v3.0.1 y el programa *JMP* para analizar los resultados. El genotipo AA para el marcador SGK1_M6 del gen *SGK1* se relacionó con una disminución del número total de lechones por parto así como en el número de lechones nacidos totales y en el de lechones nacidos vivos ($p < 0,05$). Las cerdas de genotipo AA para el marcador TAP1_M3 del gen *TAP1* presentaron una mayor tasa de lechones momificados que el resto de genotipos ($p < 0,05$). Por otro lado, las cerdas con alelo G para el mismo marcador TAP1_M3 presentaron un menor número de lechones nacidos momificados, sobretodo en la fase de brote epidémico de PRRSv ($p < 0,05$). En su conjunto, estos resultados muestran que es posible identificar marcadores moleculares en el huésped que se relacionan con una mayor resistencia a la infección por PRRSv.

Palabras clave: Cerdos, PRRSv, resistencia genética, SNP, qPCR, HRM, SGK1, TAP1.

Resum

El PRRS és actualment la patologia més important econòmicament en la producció porcina. El virus es transmet per diverses vies, entre elles la transplacentària, provocant símptomes greus en les ventrades. Fins al moment la vacunació és l'estratègia de control més utilitzada, encara que té poc èxit en el camp. En aquest estudi es van pretendre identificar gens i biomarcadors associats a caràcters de resistència a aquesta infecció. Les dades utilitzades en aquest estudi es van obtenir a partir d'una població de truges comercials ($n = 382$) en la qual es van registrar les dades reproductives, els títols de PRRSv en sang i els anticossos en fases endèmiques i en brots de la malaltia. Es va realitzar una recerca bibliogràfica per determinar les regions del genoma porcí més rellevants pel que fa a característiques reproductives i immunitàries, i es van localitzar gens candidats per aquests caràcters (*SGK1* i *TAP1*). Es va sequenciar la regió codificant d'aquests gens en un subgrup de 32 truges per identificar polimorfismes segregant aquesta població de reproductores. Es van identificar diferents polimorfismes i es van dissenyar primers específics per a aquestes regions; finalment es van seleccionar dos marcadors: SGK1_M6 i TAP1_M3. Es van genotipar els polimorfismes trobats mitjançant la tècnica qPCR-HRM. Per analitzar els resultats, es va utilitzar el progrma High Resolution Melt Programari v3.0.1 i el programa JMP. El genotip AA per al marcador SGK1_M6 del gen *SGK1* es va relacionar amb una disminució del nombre total de garrins nascuts per part així com en el nombre del nombre de garrins nascuts i en el nombre de garrins vius ($p < 0,05$). Les truges de genotip AA per al marcador TAP1_M3 del gen *TAP1* van presentar una major taxa de garrins momificats que la resta de genotips ($p < 0,05$). D'altra banda, les truges amb allele G per al mateix marcador TAP1_M3 van presentar un menor nombre de garrins nascuts momificats, sobretot en la fase de brot epidèmic de PRRSV ($p < 0,05$). Conjuntament, aquests resultats demostren que es possible identificar marcadors moleculars en l'hoste que es relacionen amb una major resistència a l'infecció per PRRSv.

Paraules clau: Porcs, PRRSv, resistència genètica, SNP, qPCR, HRM, SGK1, TAP1,

Abstract

PRRS is currently the most economically important pathology in pig production. The virus can be transmitted in several pathways, including transplacental, causing severe symptoms in litters. Until now, vaccination is the most used control strategy, although it has little success in the field. This study is aimed to identify genes and biomarkers associated with resistance characters to this infection. A population of commercial sows ($n = 382$) in which reproductive data, PRRSv titers in blood and antibodies data was recorded in endemic phases and in outbreaks of the disease. A bibliographic search was carried out to determine the most relevant porcine genome regions in terms of reproductive and immune characteristics. Candidate genes for this characteristics were located: *SGK1* and *TAP1*. The coding region of those genes was sequenced in a subgroup of 32 sows in order to identify polymorphisms segregating this population. Different polymorphisms were identified and specific primers were designed for these regions; finally, two markers were selected: SGK1_M6 and TAP1_M3. The polymorphisms found by the qPCR-HRM technique were genotyped. The High Resolution Melt Software v3.0.1 software and the JMP program were used to analyze the results. The AA genotype for the SGK1_M6 marker of the *SGK1* gene was associated with a decrease in the number of total born piglets in a parity, and a decrease in the number of total born piglets and in the number of born alive piglets ($p < 0.05$). The AA genotype sows for the TAP1_M3 marker of the *TAP1* gene had a higher rate of mummified piglets than the rest of the genotypes ($p < 0.05$). On the other hand, sows with G allele for the same marker TAP1_M3 presented a lower number of mummified piglets, especially in the epidemic outbreak phase of PRRSv ($p < 0.05$). Altogether, these results show that it is possible to identify molecular markers in the host related to a greater resistance to the infection by PRRSv.

Key words: Pigs, PRRSv, genetic resistance, SNP, qPCR, HRM, SGK1, TAP1.

Índice del trabajo de final de grado

1. Introducción	1
1.1. Situación actual	2
1.2. Patogenia y epidemiología del síndrome respiratorio y reproductivo porcino	4
2. Motivaciones y origen del trabajo	6
3. Objetivos	8
4. Material y métodos	9
4.1. Búsqueda bibliográfica	9
4.2. Obtención del material genético	9
4.2.1. Origen de los animales estudiados y fenotipado de la resistencia al PRRSv	10
4.2.2. Obtención de los datos reproductivos	10
4.2.3. Procesado del material genético	12
4.3. Diseño experimental	13
Fase 1. Utilización de herramientas bioinformáticas para escanear y analizar regiones relevantes del genoma porcino	14
Fase 2. Amplificación y secuenciación de las regiones codificantes y promotoras proximales de genes candidatos	17
Fase 3: Identificación de polimorfismos	23
Fase 4. Genotipado de los polimorfismos seleccionados en el biobanco de 400 cerdas caracterizadas para la respuesta a PRRSv	23
5. Resultados y análisis estadístico	28
5.1. Amplificación de los genes SGK1 y TAP1	28
5.1.1. Optimización de PCRs	28
5.1.2. Amplificación en madres R y S	29
5.1.3. Descripción de polimorfismos	29
5.2. Genotipado de las mutaciones SGK1_P1 y TAP1_P6	31
5.2.1. Cálculo de las frecuencias génicas y equilibrio HW	31
5.2.2. Estudio de asociación y clasificación R/S	33
5.2.3. Estudio de asociación con caracteres reproductivos	35
6. Discusión	40
7. Conclusiones y posibilidades de mejora	42
8. Referencias bibliográficas	43
9. Programario	46

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los signos clínicos más frecuentes en cerdos infectados con PRRSv, según el sexo y la edad.	1
Tabla 2. Resumen de datos reproductivos recopilados (2016-2018): media, desviación estándar, mínimos y máximos de NT, NTM, NV, NM, MM, NLP y mortalidad.	11
Tabla 3. Comparación de los datos reproductivos en cuanto la situación del PRRSv en la explotación (brote o endémico). Media, desviación estándar (SD), mínimo, máximo, rango y % del total.	12
Tabla 4. Muestras utilizadas en la segunda fase del estudio, concentración de ADN (redondeada a un decimal) y dilución aplicada.	13
Tabla 5. Regiones relevantes en cuanto a características reproductivas y resistencia genética a PRRSv. Nombre SNP indica el código de referencia de cada marcador en la base de datos SNPdb (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). La localización se indica en pares de bases.	15
Tabla 6. Resumen de la localización, función molecular y características de los genes candidatos seleccionados.	15
Tabla 7. <i>Primers</i> diseñados en la segunda fase del estudio de los genes SGK1 y TAP1.	17
Tabla 8. <i>Master mix</i> utilizada para la comprobación de la eficiencia de los <i>primers</i> diseñados.	19
Tabla 9. <i>Primers</i> seleccionados después de la primera amplificación. Se asignó un número a cada primer para facilitar el reconocimiento de los mismos durante las tareas laborales.	21
Tabla 10. <i>Primers</i> diseñados en la tercera fase del estudio en base a las mutaciones halladas durante el genotipado.	23
Tabla 11. <i>Primers</i> seleccionados para el genotipado (Fase 4).	24
Tabla 12. Componentes de la <i>Master mix</i> preparada para realizar la qPCR.	25
Tabla 13. Resumen de las mutaciones halladas en el gen <i>SKG1</i> mediante qPCR-HRM.	30
Tabla 14. Resumen de las mutaciones halladas en el gen <i>TAP1</i> mediante qPCR-HRM.	31
Tabla 15. Frecuencias génicas de los distintos alelos.	32
Tabla 16. Cálculo de las frecuencias HW de los marcadores estudiados. Fuente: Software OEGE	32
Tabla 17. Cantidad de cerdas clasificadas como 0 o 1 según la presencia de virus en sangre a día 7 y 21 post vacunación (1 animales positivos, 0 animales negativos al virus) y según el título de anticuerpos contra PRRSv a día 42 post vacunación.	33
Tabla 18. Resultados obtenidos del efecto de los marcadores estudiados sobre la clasificación por virus y para la clasificación por anticuerpos.	33
Tabla 19. <i>Odds ratio</i> del marcador SGK1_M6 en cuanto a clasificación PCR (viremia 0 respecto a 1).	34
Tabla 20. <i>Odds ratio</i> del marcador SGK1_M6 en cuanto a clasificación ELISA (Anticuerpos; clasificación 0 respecto a 1).	34
Tabla 21: Resumen del análisis de asociación entre caracteres reproductivos y cada uno de los marcadores estudiados (SGK1_M6 y TAP1_M3).	35
Tabla 22. Resultado del análisis de asociación de las variantes (Y) respecto a los efectos fijos (X): Lote, Paridad, Clasificación PCR, Clasificación Ac y Título final. Valores de R cuadrado.	36
Tabla 23. Resumen de los resultados significativos extraídos de la comparación de mínimos cuadrados según el genotipo de los marcadores SGK1_M6 y TAP1_M3.	36

Índice de figuras

Figura 1. Porcentaje de lechones perdidos respecto al total nacidos en cerdas clasificadas como Resistentes (R) o Sensibles (S) según el estudio de Abella et al., (2019).	6
Figura 2. Fotografía obtenida después de la exposición del gel de agarosa a una cámara de rayos UV. Los primers seleccionados aparecen en color verde, los primers descartados en color rojo. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las muestras elegidas aleatoriamente y “-“ hace referencia al control negativo.	27
Figura 3. Fotografía obtenida después de la exposición del gel de agarosa 2 a una cámara de rayos UV. Los primers seleccionados aparecen en color verde, los primers descartados en color rojo. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las muestras elegidas aleatoriamente y “-“ hace referencia al control negativo.	27
Figura 4. Ejemplo de curvas alineadas obtenidas mediante High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied Biosystems™ del primer 6 del gen TAP1. Las muestras de animales “AA” se observan en rojo, las muestras de los animales “GA” en verde y las muestras de los animales “GG” en azul.	26
Figura 5. Ejemplo de gráfico “Difference Plot” obtenido mediante High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied Biosystems™ del primer 6 del gen TAP1. Las muestras de animales “AA” se observan en rojo, las muestras de los animales “GA” en verde y las muestras de los animales “GG” en azul.	26
Figura 6. Ejemplo de la visualización de bandas en gel de agarosa obtenidas mediante electroforesis de los primers 1 y 2. Los primeros 32 pocillos (sin contar el marcador de peso molecular) corresponden al <i>Primer 1</i> y los 4 finales corresponden al <i>Primer 2</i> .	29
Figura 7. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a lechones nacidos totales del marcador SGK1_M6.	37
Figura 8. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a nacidos totales muertos del marcador SGK1_M6.	37
Figura 9. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a nacidos vivos para el marcador SGK1_M6.	38
Figura 10. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: izquierda o brote de PRRS: derecha) en cuanto a lechones momificados del marcador TAP1_M3.	39
Figura 11. Procesamiento de antígenos mediado por el MHC I.	41

Acrónimos

- Bp: pares de bases
- cDNA: ADN complementario
- MHC: *major histocompatibility complex*, complejo mayor de histocompatibilidad.
- NT: número de lechones nacidos totales.
- NV: número de lechones nacidos vivos.
- NM: número de lechones nacidos muertos.
- MM: número de lechones momificados.
- NTM: número de lechones nacidos muertos totales.
- NLP: número de lechones perdidos por camada.
- qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- HRM: *High resolution melting*, análisis de alta resolución de fusión.
- PRRS: *porcine reproductive and respiratory syndrome*, síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- PRRSv: *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- SNP: *single nucleotid polymorfism*, polimorfismo de nucleótido único.
- S/P ratio: *sample-to-positive ratio*
- SSC1: Cromosoma 1 del *Sus scrofa*
- SSC4: Cromosoma 4 del *Sus scrofa*
- SSC7: Cromosoma 7 del *Sus scrofa*

Glosario

- Ciclo cerrado: En este tipo de manejo los animales van entrando y saliendo de una misma sala, sin llegar nunca a tenerla totalmente vacía. Con este manejo las enfermedades que puedan desarrollarse en alguno de los lotes quedan para siempre en la granja ya que la enfermedad se transmite a los lotes posteriores.
- Epítopo: es la secuencia de una molécula a la que se unen los anticuerpos para reconocimiento de esta por parte del sistema inmunitario.
- Inmunidad adquirida: es aquella respuesta inmune que dirige su ataque a un antígeno específico que se ha encontrado con anterioridad. En ella participan sobretodo los linfocitos (células T y células B) pero también las células dendríticas, las citoquinas y el sistema del complemento.
- Inmunidad innata: es un tipo de inmunidad congénita que produce una respuesta inmediata pero inespecífica frente a antígenos invasores. Está mediada por monocitos (que se desarrollan en macrófagos), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK y también por citoquinas y el sistema del complemento.
- Interferón: proteínas señalizadoras secretadas por la célula huésped en respuesta a la presencia de antígenos y que generan la activación de la respuesta anti-antígeno en las células cercanas a la célula infectada.
- Marcador genético: fragmento de ADN de localización conocida.
- Petequias: lesiones de pequeño tamaño y color rojo que aparecen en la piel como consecuencia de la extravasación de eritrocitos cuando se daña un capilar sanguíneo.
- SNP: es una variación que afecta a un solo nucleótido de la secuencia de ADN.

1. Introducción

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, de sus siglas en inglés) fue descrito por primera vez en EEUU a mediados de los 80. En 1991 se aisló el virus causal (PRRSv), que fue clasificado dentro del orden Nidovirales, en la familia de los arteriviridae. Se trata de un virus con un genoma de ARN de cadena sencilla del que se ha descrito un elevadísimo número de cepas. Estas cepas se pueden clasificar en cepas Americanas (también conocidas como de genotipo 2, a menudo muy virulentas) que se extienden en América y Asia, y las cepas Europeas (o de genotipo 1), presentes en Europa. Pese a esta clasificación inicial, actualmente es posible aislar cepas de genotipo 1 y 2 en todos los países afectados por esta enfermedad.

Los signos clínicos del PRRS varían según la cepa del virus, el estado inmunológico de los cerdos y otros factores de gestión de la explotación; la infección también puede ser asintomática. La enfermedad clínica en una explotación puede ser consecuencia tanto de la viremia aguda en individuos, como de la transmisión transplacentaria de virus procedentes de cerdas virémicas a sus fetos. La transmisión transplacentaria puede ocurrir en cualquier momento, aunque las infecciones en el último tercio de la gestación suelen provocar los síntomas más graves en las camadas. Las infecciones simultáneas con otros patógenos también son frecuentes. Los cerdos de engorde manifiestan un cuadro respiratorio grave, acompañado de inapetencia, letargia, hipertermia, petequias en la piel, y un gran retraso en el crecimiento, tal como se describe en la **Tabla 1**. En las granjas de reproductoras, las cerdas infectadas muestran un cuadro reproductivo de la enfermedad, que se manifiesta en forma de abortos, mortalidad perinatal, fetos momificados y camadas más pequeñas y débiles, así como retorno aciclico al estro cuando la infección se da durante las primeras semanas de gestación (**Tabla 1**). Estos problemas reproductivos pueden persistir durante 4-8 meses antes de volver a la normalidad. También aparecen coloraciones rojizas/azuladas en orejas y vulva. (Karniychuk & Nauwynck, 2013).

Tabla 1. Resumen de los signos clínicos más frecuentes en cerdos infectados con PRRSv, según el sexo y la edad.

Cerdas	Camadas	Cerdos de engorde
Inapetencia y letargia	Nacidos muertos	Inapetencia y letargia
Hipertermia	Alta mortalidad perinatal	Retraso en el crecimiento
Partos prematuros y abortos	Lechones débiles de peso muy variable	Dispnea, respiración rápida y forzada.
Mortalidad ~10% de las cerdas.	Momias	Petequias en la piel

1.1. Situación actual

El virus PRRSv está extendido mundialmente a excepción de Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza. Es la patología más importante económicamente de la producción porcina en América del norte, Europa y Asia (Boddicker et al., 2012) ya que se estima que el coste de este virus en Estados Unidos gira en torno a 644 millones de dólares anuales (Holtkamp et al., 2013), y de casi 1.5b €/año en Europa.

En los últimos años los esquemas de mejora genética en porcino se han centrado en mejorar la eficiencia de la producción de magro, y también en algunos parámetros de calidad como el contenido de grasa intramuscular, que está correlacionada con la cantidad de retención de agua de la carne. Sin embargo, durante su desarrollo y durante su vida posterior, los cerdos de producción están expuestos a una diversidad de estímulos que surgen de sus entornos internos y externos. Entre los desafíos externos que afectan al ganado, la infección con patógenos virales o bacterianos representa pérdidas importantes debido a la caída de la productividad y los costes veterinarios. Durante el período de crianza, es probable que ocurran muchos eventos, como circulación de virus subclínica o brotes de enfermedades con signos clínicos evidentes. Las enfermedades tienen efectos en cascada sobre la productividad de los animales afectados, ya que los nutrientes se desvían para luchar contra las enfermedades. En consecuencia, los animales enfermos convierten los alimentos de manera menos eficiente en productos de renta. Por el contrario, los animales resistentes presentarán un fenotipo más robusto y enfrentarán mejor los desafíos internos y externos.

Aunque actualmente la vacunación es una de las principales estrategias de control para el PRRSv (Karniychuk & Nauwynck, 2013), hoy en día se ha demostrado poco éxito en campo. Esto es debido a dos razones: la heterogeneidad antigénica de las cepas del virus campo y las estrategias de evasión que el PRRSv utiliza para evitar la inmunidad innata y adquirida del animal. Gómez-Laguna et al., (2011) afirmaron que el PRRSv interfiere con la presentación del antígeno y con la mediación de los anticuerpos durante la respuesta inmune; también puede reducir la superficie celular donde se expresan proteínas virales y es capaz de proteger sus epítomos, de forma que es más difícil que los anticuerpos se unan a ellos para identificarlos. En particular, interfiere con la regulación de la producción del interferon alfa tipo 1, lo que empeora la inducción de la inmunidad adquirida.

Por ello, estudios más recientes indican que existe un componente genético en la respuesta inmune del cerdo frente al PRRSv. Así, el resultado de la infección depende, a demás de factores ambientales como el estado sanitario de la granja y del animal, del genoma del patógeno (virulencia) y del genoma del huésped. Actualmente, se están investigando estrategias complementarias para la prevención de esta enfermedad basadas en la identificación de nuevos marcadores genéticos, que permitan seleccionar características de resistencia al PRRSv en cerdas reproductoras.

En un experimento previo, el Consorcio para la Resistencia Genética a PRRSv (PHGC) de los Estados Unidos realizó un barrido genómico con microchips de 60.000 marcadores. Este estudio identificó regiones genómicas asociadas con la carga viral en los cromosomas 4 (SSC4) y SSCX, mientras que las regiones en los cromosomas SSC1, SSC4, SSC7 y SSC17 se asociaron con ganancia de peso. Además, tanto la carga de virus como la ganancia de peso se asociaron con una única región genómica en SSC4, que puede ser representada con un único marcador de SNP (del inglés *single nucleotide polymorphism*), WUR10000125, que explicaba el 15,7% de la varianza genética para carga viral y el 11,2% de ganancia de peso (Boddicker et al. 2012).

Posteriormente (Serão et al. 2014), se genotiparon cerdas cuyos datos reproductivos eran conocidos, para estimar la heredabilidad de dichos datos reproductivos en situación con y sin infección y para encontrar regiones del genoma causantes de la variabilidad genética. No solo se encontraron datos significativos de asociación genética entre la respuesta de los anticuerpos contra el PRRSv y los datos reproductivos para los nacidos muertos; sino que también se obtuvo una alta heredabilidad y correlación en el S/P (*sample to positive*) ratio, lo cual sugiere que se podrían usar los niveles de anticuerpos neutralizantes como indicadores del impacto del PRRSv en características reproductivas. En este mismo trabajo también se evidenció la falta de efecto del marcadores WUR10000125 sobre los parámetros reproductivos, tanto antes como durante la infección con este virus.

1.2. Patogenia y epidemiología del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

El PRRSv causa una infección aguda y prolongada en cerdos. El periodo de viremia se extiende 4-5 semanas, seguido de un periodo de infección persistente en el tejido linfoide que puede durar meses, en la que el nivel de replicación viral es bajo (Wills et al., 1997). Batista et al (2002) detectaron persistencia del virus de los 120 a los 180 días post infección en cerdas reproductoras.

La respuesta inmune que produce el virus en el hospedador es muy errática: el PRRSv se replica principalmente en los macrófagos alveolares porcinos y, en menor medida, en macrófagos de otros órganos y en las células dendríticas, describiéndose la replicación del virus tanto en pulmón como en los órganos linfoides (Barranco, 2011).

Posteriormente, el virus induce apoptosis y necrosis en los tejidos, interfiere con la inducción de respuesta pro-inflamatoria e induce una respuesta antiviral específica de manera muy lenta. De esta forma puede causar infecciones persistentes.

La afectación de los huéspedes por parte del virus, es significativamente distinta en las diferentes razas de cerdos. Halbur et al. (1998) encontraron que en cerdos Hampshire, las lesiones macroscópicas en pulmón eran más severas mientras que en los cerdos Meishan se detectaron títulos de antígeno de PRRSv más bajos en los pulmones pero mayor incidencia de miocarditis y encefalitis. Finalmente, los cerdos Duroc presentaron títulos de anticuerpos contra PRRSv en suero significativamente más bajos que el resto.

El PRRSv se puede transmitir horizontalmente (Karniychuk & Nauwynck, 2013) tanto por contacto entre las cerdas reproductoras (Bierk et al., 2001), como mediante el semen de machos reproductores infectados (Yaeger et al., 1993).

Cuando la madre se infecta, aunque la viremia sea breve, es suficiente para que el PRRSv llegue al feto. El mecanismo es el siguiente: en base a los estudios de Feng, Nagy, Pyne, Dvorak & Dvorak (1998) en cobayas sobre la migración transendotelial de glóbulos blancos, probablemente los monocitos de la sangre en cerdos, de la misma manera que pasa en cobayas, pasan a través de las paredes de la vascularización endometrial mediante diapédesis hacia el tejido conectivo endometrial para posteriormente diferenciarse en macrófagos por extravasación.

La diapédesis de los monocitos puede suceder por migración directa a través de la monocapa de células endoteliales (vía transcelular) o entre células endoteliales (vía paracelular). Antes o durante la diapédesis, los monocitos en sangre pueden unirse al PRRSv también circulante en sangre, e infectarse. A continuación, el PRRSV es capaz de travesar el epitelio uterino y las capas del trofoblasto para luego replicarse en el endometrio e infectar la placenta.

El mecanismo mediante el cual el virus atraviesa la barrera del epitelio uterino-trofoblasto es desconocido; actualmente existen tres hipótesis sobre como esto ocurre (Karniychuk et al., 2013):

- Las partículas libres del virus atraviesan directamente el epitelio uterino y las células del trofoblasto.
- El PRRSv asociado a células se propaga desde el endometrio hacia el embrión dentro o encima de macrófagos que migran desde la madre hacia el feto.
- El virus se propaga célula a célula desde los macrófagos endometriales infectados hacia el epitelio uterino y consecuentemente, a través de las células del trofoblasto hacia los macrófagos de la placenta. Esta es la teoría menos probable ya que se determinó que el PRRSv tiene tropismo hacia macrófagos de tipo $Sn^{+}CD163^{+}$ y el epitelio uterino y el trofoblasto no expresan este tipo de moléculas. Por lo tanto, pueden no ser susceptibles a la infección.

Tal y como Nielsen, Rønsholt & Sørensen (1991) demostraron con el parvovirus porcino; PRRSv también se puede diseminar *in utero* entre los diferentes fetos mediante las membranas fetales o a través de las anastomosis vasculares que existen los allantoconios de cada concepto.

2. Motivaciones y origen del trabajo

En el marco de esta aproximación, investigadores del *Grup de Recerca del Porcí (2017 SGR 1193)* han trabajado en los últimos años en la identificación, caracterización y validación de nuevos marcadores moleculares para resistencia genética a PRRS (Gol et al. 2015; Pena et al. 2018) así como en el desarrollo de protocolos de fenotipado para el carácter de resistencia (Abella et al. 2016; Pena et al. 2018). Estos trabajos han abierto una nueva línea de investigación cuyo objetivo es la identificación de genes y biomarcadores asociados a caracteres de resiliencia a infecciones en cerdos en condiciones de granja.

Así, en colaboración con una empresa del sector, se está haciendo un seguimiento longitudinal a una población de cerdas comerciales ($n \sim 600$) en las que se ha registrado, durante un mínimo de un parto y un máximo de 7, datos reproductivos relacionados con la prolificidad: número de lechones nacidos totales, nacidos vivos, nacidos muertos y momificados. El diseño de este experimento se explica con más detalle en el apartado de Material y Métodos, resumido a continuación. Los animales fueron vacunados frente a PRRSv a la salida de transición y se registró su respuesta virémica a los 0, 7 y 21 días post vacunación (DPV). Las cerdas que no desarrollaron viremia tras la vacunación se clasificaron como R (por Resistentes) y las que presentaron viremia a los 7 y/o 21 DPV, como S (Sensibles) (Abella et al., 2019). Las cerdas se llevaron a una granja de reproductoras catalogada como PRRSv estable positiva según la clasificación de Holtkamp et al. (2011).

Durante este periodo se ha detectado un brote de PRRS en la granja, que han sido confirmados por métodos serológicos y moleculares. Se ha observado que las hembras R tienen menos pérdidas (nacidos muertos o momias) tanto antes como durante una infección con PRRSv (Abella et al., 2019) tal como se muestra en la **Figura 1**.

A partir de esta observación se formula la hipótesis de que estas diferencias de susceptibilidad al PRRSv son debidas (en parte) a diferencias genéticas entre los dos grupos de hembras donde las cerdas que soportan

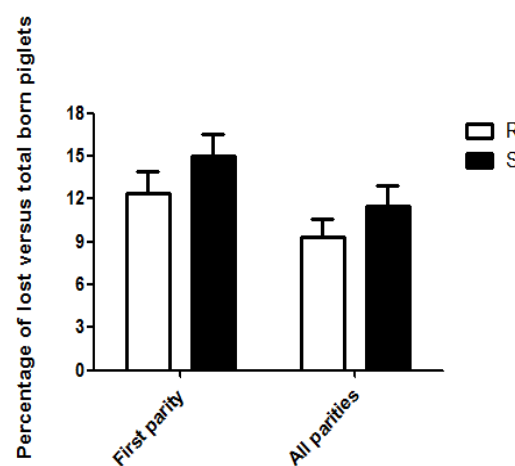


Figura 1. Porcentaje de lechones perdidos respecto al total nacidos en cerdas clasificadas como Resistentes (R) o Sensibles (S) según el estudio de Abella et al. (2019).

mejor la enfermedad presentan una cierta resistencia genética a la infección

Por tanto, en este trabajo de final de grado se pretende identificar nuevos marcadores moleculares en genes mapeados en regiones genómicas asociadas a la susceptibilidad a PRRSv. En estos momentos se dispone de muestras de sangre de un total de ~ 400 cerdas y de una base de datos depurada con los datos reproductivos que incluye fase endémica y epidémica de la enfermedad.

El proyecto es innovador en cuanto a que hasta la fecha sólo hay un marcador molecular validado que ofrece una cierta resistencia a esta enfermedad. La validación de otros marcadores (en otras poblaciones) y la descripción de nuevas mutaciones con efecto sobre la resistencia a la enfermedad es un ámbito de gran interés en este momento tanto en Europa, como en Estados Unidos.

3. Objetivos

Este Trabajo de Final de Grado se ha desarrollado en el *Grup de Recerca del Porcí (2017 SGR 1193)* en el marco del proyecto de investigación “*Novel strategies to control the respiratory and reproductive porcine syndrome virus (REGEVA)*” con código COMRDI16-1-0035-03 y financiado con fondos FEDER. El objetivo científico de este Trabajo de Final de Grado es participar en el proceso de identificación de nuevos marcadores moleculares porcinos relacionados con la resistencia genéticas a PRRSv. En último término, se trata de identificar variantes genéticas o biomarcadores con los que contribuir al desarrollo de nuevos criterios de selección relacionados con la resiliencia y una producción más sostenible.

Para la consecución de este objetivo se plantean los siguientes subobjetivos:

1. Analizar *in silico* de las regiones genómicas relevantes para resistencia genética a PRRSv.
2. Diseñar y optimizar estrategias de caracterización y secuenciación de genes.
3. Comparar secuencias e identificación de nuevas mutaciones.
4. Diseñar y optimizar protocolos de genotipado rápidos basadas en técnicas de PCR-HRM (*high resolution melting*).
5. Describir la asociación entre los genotipos de las cerdas y sus caracteres reproductivos, su respuesta virémica y sus niveles de anticuerpos tras la vacunación con PRRSv.

4. Material y métodos

4.1. Búsqueda bibliográfica

El contenido bibliográfico de este trabajo se ha basado en la búsqueda de artículos científicos en distintas bases de datos, incluyendo: *Google Scholar* o *Google Académico* (<https://scholar.google.es/>), un buscador de google enfocado y especializado en la búsqueda de contenido y literatura científico-académica; *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), un motor de búsqueda de libre acceso de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica y *Scopus* (<https://www.scopus.com/>) una base de datos de referencias bibliográficas y citas de la empresa Elsevier.

En muchos casos se ha utilizado *Sci-hub* (<http://sci-hub.tw/>), un buscador especializado que permite obtener acceso a una gran cantidad de publicaciones y artículos científicos sin restricciones. También se ha utilizado el generador de referencias de *Scribbr* (<https://www.scribbr.es/detector-de-plagio/generador-apa/>) para citar las distintas fuentes e incluirlas en la bibliografía siguiendo las normas APA (*American Psychological Association*).

4.2. Obtención del material genético

Las muestras de ADN analizadas para la realización de este Trabajo de Final de Grado se han obtenido de un estudio anterior sobre la identificación de cerdas resistentes en explotaciones infectadas por PRRSv (Abella et al., 2019).

Se trata de muestras de 382 cerdas estudiadas a lo largo de 3 años. A continuación se detalla el origen de estos animales y los procedimientos que se realizaron para la obtención de datos reproductivos. Los animales estudiados son la descendencia de 1500 cerdas de raza cruzada Landrace x Large White provenientes de una explotación PRRSv negativa, pero trasladadas a una granja de producción PRRSv estable positiva. Esta explotación pertenecía a una gran integradora Española (Pinsos del Segre S.A, Lleida, España).

4.2.1. Origen de los animales estudiados y fenotipado de la resistencia al PRRSv

En primer lugar, se inseminaron artificialmente a las cerdas reproductoras disponibles de la primera explotación con 16 machos y se obtuvieron 517 lechonas de 116 camadas, nacidas en 4 bandas bisemanales durante 12 meses.

Las lechonas obtenidas se vacunaron a las 6-7 semanas de edad con una vacuna de PRRSv viva modificada (MLV-PRRSv - Porcilis PRRS® MSD Animal Health) y se tomaron muestras de sangre a los 0, 7, 21 y 42 días post vacunación. De las muestras de sangre se extrajo el suero.

A continuación, con el objetivo de clasificar las 517 lechonas como resistentes (R) o susceptibles (S) al PRRSv, se quiso determinar la viremia mediante un kit comercial basado en una PCR semi-cuantitativa con sondas Taqman (marcadas fluorescentemente). La PCR fue realizada por el Grupo de Saneamiento Porcino (GSP) de Lérida, España. Para realizar esta técnica, se aisló el ARN total a partir de suero obtenido de las muestras utilizando el kit: MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los resultados se dieron como positivos o negativos según el valor límite (Ct) establecido ($Ct < 40$ = positivo). Se consideraron a los animales con fenotipo R aquellos cuyo suero sanguíneo era negativo a PRRSv según los resultados obtenidos por PCR a día 7 y 21 post vacunación; y se clasificaron como S a los animales cuyas muestras recolectadas a día 7 y/o 21 post-vacunación eran positivas.

Las muestras recolectadas a día 42 post vacunación se procesaron en el mismo laboratorio para determinar el título de anticuerpos contra PRRSv (S/P ratio) mediante un kit ELISA (IDEXX PRRS X3, IDEXX laboratories Inc, Westbrook, Maine, USA).

4.2.2. Obtención de los datos reproductivos

De las 517 cerdas iniciales, se realizó un seguimiento reproductivo de 382 provenientes de 110 camadas. El resto de animales se consideraron no aptos a causa de la mortalidad natural durante el crecimiento, cojeras, conformación de patas, número de mamas funcionales y hernias umbilicales o inguinales.

Las cerdas tenían 7 meses de edad y un peso de 130 kg cuando se trasladaron a una explotación nueva. En la unidad de cuarentena se vacunaron contra parvovirus porcino, virus de Aujeszky, influenza porcina Erysipelotrix rhusiopathie, PCV2 y Mhyo.

A continuación se trasladaron en la unidad de reproducción donde fueron inseminadas artificialmente. De nuevo, se descartaron los animales que repetían celos, sufrían cojeras crónicas, prolapsos rectales o vaginales o tenían una condición corporal menor de 2 (en escala del 1-3).

Durante 3 años (2016-2018) se registraron la tasa de partos, el número de nacidos vivos (NV), el número de nacidos muertos (NM) y el número de momificados (MM) por camada. Los lechones momificados son aquellos fetos que mueren a partir del día 30 de gestación, en cuyo momento ya tienen una estructura esquelética desarrollada y no pueden ser reabsorbidos completamente. Se calculó el número de nacidos totales (NT) sumando los NV y los NM; también se calculó el número de nacidos totales contando los momificados (NTM) sumando los NT y los MM. Finalmente se calculó el número de lechones perdidos por camada (NLP) sumando los NM y los MM y la mortalidad (NLP/NTM). Estos datos se tomaron tanto en situaciones de PRRSv endémico como en situaciones de brote de la enfermedad (**Tabla 3**).

Tabla 2. Resumen de datos reproductivos recopilados (2016-2018): media, desviación estándar, mínimos y máximos de NT, NTM, NV, NM, MM, NLP y mortalidad.

	NT (NV+NM)	NTM (NT+MM)	NV	NM	MM	NLP (NM+MM)	Mortalidad NLP/NTM
Media	13,50	13,71	11,74	1,76	0,20	1,97	13,16
SD	3,67	3,77	3,32	2,05	0,77	2,27	14,28
Mín.	2	2	0	0	0	0	0
Máx.	24	25	21	20	11	20	100

Utilizando las mismas muestras de los animales comentados anteriormente, Abella et al. (2019) obtuvieron resultados que indicaban la presencia de variación genética asociada al criterio R/S. También hallaron relaciones positivas en animales resistentes respecto a la respuesta de anticuerpos y las cerdas S tuvieron estadísticamente unos niveles superiores de anticuerpos a día 42 post vacunación que las cerdas R.

Tabla 3. Comparación de los datos reproductivos en cuanto la situación del PRRSv en la explotación (brote o endémico). Media, desviación estándar (SD), mínimo, máximo, rango y % del total.

		NT (NV+NM)	NTM (NT+MM)	NV	NM	MM	NLP (NM+MM)	Mortalidad NLP/NTM
Situación endémica	Media	13,41	13,51	11,74	1,67	0,10	1,77	11,95
	SD	3,67	3,73	3,30	2,00	0,44	2,07	13,23
	Mín.	2	2	0	0	0	0	0
	Máx.	24	24	21	20	4	20	100
	Rango	22	22	21	20	4	20	100
	% del total	99,26 %	100 %	86,90 %	12,36 %	0,74 %	13,10 %	13,10 %
Brote de PRRSv	Media	14,25	15,22	11,75	2,50	0,97	3,47	21,60
	SD	3,64	3,81	3,52	2,26	1,68	2,98	18,06
	Mín.	3	3	0	0	0	0	0
	Máx.	24	25	21	11	11	15	100
	Rango	21	22	21	11	11	15	100
	% del total	93,63 %	100 %	77,20 %	16,43 %	6,37 %	22,80 %	22,80 %

De las 382 cerdas estudiadas, 136 tenían el fenotipo R y 246 el fenotipo S. Abella et al. (2019), encontraron evidencias de que las cerdas S tenían más nacidos por camada que las cerdas de fenotipo R. Aunque las cerdas S tenían un mayor número de nacidos por camada, sufrían una mayor mortalidad en el parto en comparación con las cerdas R. Durante el brote de PRRSv, las cerdas S tenían el doble de posibilidades de dar a luz a lechones momificados que las cerdas R. La probabilidad de la pérdida de un lechón fue mayor (P igual a 0,97) en camadas de cerdas S que en R independientemente de si los partos ocurrían o no en un periodo de brote del virus.

4.2.3. Procesado del material genético

Teniendo en cuenta los datos de la carga viral a día 7 y a día 21 post-vacunación, así como los valores de NTB, NLP registrados, se seleccionaron del total de 382 cerdas, las muestras de ADN de las 16 cerdas más resistentes y las 16 cerdas más sensibles para trabajar con ese ADN para desarrollar la fase 2 del estudio, aunque para los resultados finales se utilizó el total de la población.

En primer lugar, se estandarizaron todas las muestras a una concentración de ADN de 20 ng/μl. Se utilizó el espectrofotómetro de microgota (Nanodrop®) para analizar la concentración de ADN de cada muestra y se aplicó una dilución en agua específica a cada una de ellas en base a los resultados. Los datos obtenidos se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Muestras utilizadas en la segunda fase del estudio, concentración de ADN (redondeada a un decimal) y dilución aplicada.

Madres R	Conc. ADN (ng/μl)	Dilución aplicada	Madres S	Conc. ADN (ng/μl)	Dilución aplicada
395	82,0	1:4	130	87,0	1:4
393	18,9	-	56	28,5	-
400	13,4	-	104	24,2	-
58	175,1	1:8	7	74,4	1:4
96	82,6	1:4	285	109,9	1:5
342	18,8	-	284	38,2	1:2
309	42,0	1:2	23	390,3	1:15
310	39,0	1:2	77	10,5	-
84	21,8	-	72	45,4	1:2
28	20,1	-	31	41,5	1:2
372	12,6	-	257	39,8	1:2
375	235,6	1:10	397	91,5	1:4
378	65,5	1:3	385	306,5	1:15
379	166,5	1:8	779	426	1:20
807	116,5	1:6	757	72,1	1:3
599	41,0	1:2	329	4,6	-

4.3. Diseño experimental

Este proyecto se dividió en las siguientes 4 fases:

Fase 1. Utilización de herramientas bioinformáticas para escanear y analizar regiones relevantes del genoma porcino

En la primera fase del trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar las regiones del genoma porcino más importantes en cuanto a características reproductivas.

Serão et al. (2014), identificaron una región de 1,1 Mb en el cromosoma 1 (SSC1) del *Sus scrofa* que contiene 5 SNPs responsables del 11,04% de la varianza genética explicada por los marcadores en cuanto al número de nacidos muertos (NSB) (localizada a 28-30Mb). Este hallazgo es muy interesante en la práctica, ya que el NSB es la característica reproductiva con más heredabilidad ($0,12 \pm 0,08$) de las estudiadas y por lo tanto, la selección de animales por NSB puede ser muy interesante en la práctica. Los SNPs son: ASGA0001911, MARC0034894, ALGA0002134, MARC0019969 y ASGA00010988.

Serão et al. (2014) también identificaron 112 SNPs del cromosoma 7 (SSC7) que explicaban el 25,15% del varianza genética explicada por los marcadores en cuanto al ratio S/P. Estos SNPs se sitúan en la región de 24-27 Mb. Los SNPs más relevantes de esta región en cuanto a porcentaje de varianza genética explicada fueron: MARC0058875 y ASGA0032151. Serão et al. 2014 encontraron que este ratio S/P medido 46 días después de la infección por PRRS tiene mucho potencial genético como indicador del impacto reproductivo después de un brote de PRRS, ya que se ha comprobado que el uso de la selección indirecta de NV (número de nacidos vivos) mediante la selección del fenotipo para el ratio S/P produce una respuesta de selección 63,2% mayor que la selección directa por NV; además Serão et al. (2014) también encontraron que el ratio S/P era la única característica analizada con heredabilidad alta ($0,45 \pm 0,13$).

A continuación, se utilizó la página web Ensembl (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index) y se accedió y exploró a última versión del genoma porcino (*Sus scrofa* 11.1) disponible. Utilizando la herramienta Biomart, se realizó una búsqueda de las regiones de interés encontradas en la literatura (con un margen de ± 1 Mb) y se elaboró una tabla (**Tabla 5**) con la localización exacta de cada uno de los SNPs más importantes en cuanto a resistencia genética a PRRSv (Serão et al., 2014). Este paso fue necesario dado que este artículo se realizó sobre la versión anterior del genoma porcino (*Sscrofa* 10.2) y las posiciones indicadas en ese trabajo no corresponden con las del mapa actual.

Tabla 5. Regiones relevantes en cuanto a características reproductivas y resistencia genética a PRRSv. Nombre SNP indica el código de referencia de cada marcador en la base de datos SNPdb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). La localización se indica en pares de bases.

SSC	Carácter	Región diana	Marcador	Nombre SNP	Localización
1	NSB	± 1 Mb: 28-30 Mb	ASGA0001911	rs80879384	28772718
			MARC0034894	rs80841011	28912680
			ALGA0002134	rs80994266	29089809
			MARC0019969	rs80790432	29662167
			ASGA0001988	rs80993092	29938328
7	S/P ratio	± 1 Mb: 24-27 Mb	MARC0058875	rs80986722	24865378
			ASGA0032151	rs80947467	25967157

A continuación se realizó una búsqueda bibliográfica para caracterizar los genes candidatos que se encuentran en las regiones de interés seleccionadas anteriormente. En la **Tabla 6** se resumen los genes seleccionados como más relevantes y a continuación se describen sus funciones detalladamente:

Tabla 6. Resumen de la localización, función molecular y características de los genes candidatos seleccionados.

Gen candidato	Localización genómica	Función molecular	Características
<i>SGKI</i>	Cromosoma 1: 29.625.786 - 29.753.619	Codifica para las serina/treonina proteína quinasas que determinan el desarrollo de las células T	Supervivencia embrionaria Inmunidad maternal
<i>TAPI</i>	Cromosoma 7: 25.062.771 - 25.072.038	Está involucrado en el transporte de antígenos desde el citoplasma hasta el RE para asociarse con MHC I.	Implantación embrionaria Codificación

En el intervalo mencionado del SSC1, existen varios genes relacionados con procesos inmunitarios y reproductores. Entre ellos destaca el gen ***SGKI*** (*serum/glucocorticoid regulated kinase 1 gene*), que codifica para las serina/treonina proteína quinasas. Este gen es de gran interés ya que está relacionado con características reproductivas y de supervivencia embrionaria; Luca et al. (2009) afirmaron que “las proteínas que codifica el gen *SGKI* están involucradas en la homeostasis celular” y Salker et al. (2011) asociaron la falta de regulación del *SGKI* con **fallo reproductivo** en ratones (citado en: Serão et al. 2014). Por otro lado, Heinkab et al. (2013) afirmaron que el gen *SGKI* también es un determinante crítico en el desarrollo de las células T y por lo tanto tiene un papel

importante en la **inmunidad del animal**. Esto se debe a que las señales del eje quinasa del mTOR2-SGK1 regulan la polarización a T_{H1} - T_{H2} , promoviendo la diferenciación a T_{H2} mientras que bloquea la diferenciación a T_{H1} . Como recordatorio de inmunología, los linfocitos T migran desde la médula ósea hacia el timo, donde maduran generando células TCR y CD4 o CD8. Posteriormente, las células CD4+T derivadas del timo, se activan por antígenos específicos en la periferia y se diferencian en células T_{H1} , T_{H2} o T_{H17} . Las células T_{H1} controlan la inmunidad celular hacia los patógenos y se han asociado con la auto-inmunidad órgano-específica; en cambio, las T_{H2} controlan la inmunidad extracelular (Norton & Screaton, 2014). Posteriormente, Norton & Screaton (2014) hicieron experimentos con ratones comprobando que los ratones sin el gen *SGK1* tenían respuestas antivirales y antitumorales (por parte de células T_{H1}) superiores que los ratones del grupo control.

Por otro lado, todos los SNPs mencionados del SSC7 se localizan en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II. En la región SSC7, se seleccionó como gen candidato el gen *TAP1* (*Transporter 1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member*), un gen asociado con el procesamiento de antígenos 1, como el más relevante. Cooper et al. (1998) encontraron que la proteína *TAP1* está presente a bajos niveles en cigotos unicelulares de ratón, es decir, desde la primera división celular existe expresión del gen *TAP1*. Esta proteína incrementa la expresión de los blastocistos y por lo tanto puede jugar un papel muy importante en la **implantación embrionaria**.

A continuación, se realizó una segunda búsqueda en la página Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) sobre los dos genes candidatos: *SGK1* y *TAP1* para encontrar posibles transcritos y su secuencia completa. Esta información es necesaria para realizar el diseño de *primers* de la Fase 2 del estudio.

El gen *SGK1* se transcribe en 6 transcritos: 201, 202, 203, 204, 205 y 206. El transcrito 201 contiene todos los exones posibles del gen excepto el exón 4 (presente en el transcrito 203), el exón 5 (presente en el transcrito 205) y el exón 6 (presente en el transcrito 206). El gen *TAP1* sólo presenta 1 transcrito: el TAP1-201. El transcrito SGK1-201 está compuesto por 14 exones, el SGK1-202 por 12 exones, el SGK1-204 por 13 exones, el SGK1-204 por 13, el SGK1-205 por 12 y el SGK1-206 por 12. El único transcrito del gen *TAP1* está compuesto por 11 exones.

Fase 2: Amplificación y secuenciación de las regiones codificantes y promotoras proximales de genes candidatos

Diseño de primers

Con la información obtenida en la fase 1, se llevó a cabo el diseño de *primers* mediante el programa Primer 3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Se introdujeron las secuencias de los exónes mencionados y de zonas de cDNA, se limitó la medida del *primers* por debajo de 800-1200 bp y se establecieron como diana los nucleótidos correspondientes a los SNPs mencionados en la **Tabla 3**. Finalmente, se seleccionaron 2 *primers* (una opción A y una opción B) o 4 *primers* (1A, 1B, 2A y 2B) para cada fragmento analizado. La **Tabla 7** recoge la información de los *primers* diseñados y fabricados por la empresa Sigma-Aldrich®. Cada set de *primers* está constituido por un primer Forward (F) y un primer Reverse (R).

Tabla 7. *Primers* diseñados en la segunda fase del estudio de los genes *SGK1* y *TAP1*.

Nombre <i>Primer</i>	Secuencia 5'→ 3'	Set	Exón	Gen	Transcrito	PCR size (bp)	Tipo de muestra
SGK1_e1_F1A	tctccctctgctttttggc	A	1	SGK1	201	629	Genomic
SGK1_e1_R1A	aacctgtccttacCCGCTTC						
SGK1_e1_F1B	ctctgctttttgcgcg	B	1	SGK1	201	627	Genomic
SGK1_e1_R1B	caaaacctgtccttacCCGC						
SGK1_e15_F1A	cctggacctcttgacctga	A	15	SGK1	201	980	Genomic
SGK1_e15_R1A	AAACACCAGGCTCTGACTGA						
SGK1_e15_F1B	ACTTTGACCCCGAGTTCACC	B	15	SGK1	201	1144	Genomic
SGK1_e15_R1B	AAAGTGTGTGTTGGGAGGGG						
SGK1_e4_F1A	gaacttgcagcttgctccc	A	4	SGK1	203	327	Genomic
SGK1_e4_R1A	taaccacccgtcctctgaa						
SGK1_e4_F1B	ctttgcagcttgctcccttc	B	4	SGK1	203	320	Genomic
SGK1_e4_R1B	ccaccgtcctctgaaacat						
SGK1_e5_F1A	gggaggatgggagagtcact	A	5	SGK1	205	1157	Genomic
SGK1_e5_R1A	CTCCCCACCAGAAACTCC						
SGK1_e5_F1B	gtggggaggatgggagagt	B	4	SGK1	205	882	Genomic

Nombre <i>Primer</i>	Secuencia 5'→ 3'	Set	Exón	Gen	Transcrito	PCR size (bp)	Tipo de muestra
SGK1_e5_R1B	AAAGATTAGCCGGTGCCTCC	B	4	<i>SGK1</i>	205	882	Genomic
SGK1_e5_F2A	GGAGGCACCGGCTAATCTTT	A	5	<i>SGK1</i>	205	815	Genomic
SGK1_e5_R2A	ACTCCTTTTCTGCACCTCGG						
SGK1_e5_F2B	AGAGCTTCCCTCCCTCCTTT	B	5	<i>SGK1</i>	205	886	Genomic
SGK1_e5_R2B	gcagcggtccttacCTAGTC						
SGK1_e6_F1A	gccacttctcattgttgcg	A	6	<i>SGK1</i>	206	290	Genomic
SGK1_e6_R1A	caacgccacgcacactaatc						
SGK1_e6_F1B	agcgccacttctcattgtt	B	6	<i>SGK1</i>	206	280	Genomic
SGK1_e6_R1B	cttctcattgttgcggtggg						
SGK1_cDNA_F1A	CTGTGAACTCCCCACTGTGG	A	1-2	<i>SGK1</i>	201	953	cDNA
SGK1_cDNA_R1A	GTAACCCAAGGCACTGGCTA						
SGK1_cDNA_F1B	TCCCCACTGTGGAATGGT	B	1-2	<i>SGK1</i>	201	933	cDNA
SGK1_cDNA_R1B	ACCCAAGGCACTGGCTATTT						
SGK1_cDNA_F2A	CGGTGGAGAGTTGTTCTACCA	A	8-9	<i>SGK1</i>	201	708	cDNA
SGK1_cDNA_R2A	TCGGCTGCTTCCTTGACG						
SGK1_cDNA_F2B	TGTCCTAGACTACATTAACGGTGG	B	8-9	<i>SGK1</i>	201	701	cDNA
SGK1_cDNA_R2B	GTGAGGAGGATGCTGTCCGG						
TAP1_e1_F1A	TCGTTTTCCCTTTCCCATAA	A	1	<i>TAP1</i>	201	778	Genomic
TAP1_e1_R1A	GTCAGAAGGAGCCAGAGGTG						
TAP1_e1_F1A	TCGTTTTCCCTTTCCCATAA	B	1	<i>TAP1</i>	201	810	Genomic
TAP1_e1_R1	AGTGGGCGGGTCTAGTGAG						
TAP1_cDNA_F1A	CACCTCTGGCTCCTTCTGAC	A	1-2	<i>TAP1</i>	201	995	cDNA
TAP1_cDNA_R1A	TGGAACCTGACAAGCCCCTC						
TAP1_cDNA_F1B	CTCTGGCTCCTTCTGACCCT	B	1-2	<i>TAP1</i>	201	830	cDNA
TAP1_cDNA_R1B	AGGTGGACAGCAGTACCTGA						
TAP1_cDNA_F2A	CAGCTATGCCTACTGTCCGG	A	5-6	<i>TAP1</i>	201	850	cDNA
TAP1_cDNA_R2A	CACCCGTGCTTGACTGTTTG						
TAP1_cDNA_F2B	AGCGGAAACCTCGTCACATT	B	6-7	<i>TAP1</i>	201	818	cDNA
TAP1_cDNA_R2b	AGGATGTGATTGGCCTGCTC						
TAP1_e11_F1A	GTGGAGTCGCTCCTGTATGAA	A	11	<i>TAP1</i>	201	603	Genomic

Nombre <i>Primer</i>	Secuencia 5'→ 3'	Set	Exón	Gen	Transcrito	PCR size (bp)	Tipo de muestra
TAP1_e11_R1	AAATACCAAGAATCCACAGGGTA	A	11	TAP1	201	603	Genomic
TAP1_e11_F1B	TGGAGTCGCTCCTGTATGAA	B	11	TAP1	201	602	Genomic
TAP1_e11_R1	AAATACCAAGAATCCACAGGGTA						

Una vez recibidos los *primers* liofilizados se almacenaron a -20°C hasta su uso, y cuando fue necesario se reconstituyeron mediante la adición de agua autoclavada en la cantidad indicada por el fabricante (709 - 979 μ L) para conseguir una concentración stock de 100 μ M.

Posteriormente se creó una *primer mix* para cada uno de los sets de *primers* y se introdujo en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL. La *primer mix* está compuesta de 80 μ L de agua, 10 μ L del *primer Forward* y 10 μ L del *primer Reverse*, llevando la concentración de trabajo a 10 μ M. Posteriormente, las *primer mix* se almacenaron en un congelador a -20°C.

Se eligió un solo *primer* (opción A o opción B) para cada fragmento seleccionado. Para elegir los sets demás funcionales se realizó una PCR a tiempo final y a continuación se comprobó el resultado mediante una electroforesis. En primer lugar se hicieron las pruebas en los *primers* que funcionaban sobre ADN genómico y después en los *primers* de cDNA.

Protocolo PCR

Para realizar la PCR a tiempo final en los *primers* genómicos, se creó la *master mix* indicada en la **Tabla 8**.

Tabla 8. *Master mix* utilizada para la comprobación de la eficiencia de los *primers* diseñados.

	Concentración stock	Concentración final	Cantidad (x1)
Agua libre de nucleasas			16,5 μ L
ADN	20 ng/ μ M	60ng	3 μ L
Buffer	x10	x1	2,5 μ L
Mg 50mH	50 mM	2 mM	1 μ L
Primer mix	10 μ M	0,4 μ M	1 μ L
dNTP	5 mM (0,16 mM)	0,16 mM	0,8 μ L
Taq ADN Polimerasa	5U/ μ L	1U	0,2 μ L
Total			25 μL

En primer lugar se mezclaron en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL todos los componentes de la *Master mix*, se centrifugó el tubo y se dispersaron, mediante una pipeta automática de la marca Thermo Labsystems®, 21,8 μ L de *Master mix* en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. A continuación se dispensaron también 1 μ L /pocillo de *primer mix*; cada *primer* se dispersó en 4 pocillos. Finalmente se seleccionaron 3 muestras aleatorias de ADN de las comentadas en la **Tabla 2**, y se dispersaron 3 μ L de cada una de ellas en 3 pocillos distintos de cada *primer*. Se añadieron 3 μ L de agua autoclavada a un pocillo de cada *primer* como control negativo.

La optimización de las PCR se llevó a cabo mediante el empleo de un termociclador Veriti con gradiente de temperatura (Applied Biosystems). Se optimizaron las temperaturas de la siguiente forma: en primer lugar, hubo un ascenso de temperatura hasta 95°C y se mantuvo 5 minutos.

- La desnaturalización se llevó a cabo a 95 °C durante 15 segundos.
- En la fase de alineamiento descendió la temperatura hasta los 60°C durante 30 segundos.
- En fase de extensión, la temperatura se ajustó a los 72°C para dejar actuar la Taq polimerasa durante 1 minuto.

Estas fases se repitieron 35 veces para amplificar las regiones deseadas.

Comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa

A continuación se comprobó la especificidad de los fragmentos amplificados mediante electroforesis horizontal submarina en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio. Los geles de agarosa se cargaron 5 μ L de muestra (con el tampón de carga ya incorporado). Cada 8 pozos se dejó uno vacío para cargar posteriormente 5 μ L de marcador de peso molecular (GeneRuler 100-bp DNA ladder, ThermoFisher) para utilizar posteriormente como referencia del tamaño de los fragmentos estudiados.

A continuación se aplicaron 100V de corriente durante 15-20 minutos en la cubeta electroforética y cuando finalizó este tiempo, se retiró el gel y se introdujo en una cámara de luz UV. Mediante el programa informático MegaCapt se tomaron fotografías de los geles bajo esta luz (Ejemplo en figuras 2 y 3, pág. 28) para determinar con qué *primer* se obtenía un mejor resultado.

Basándose los resultados obtenidos, se escogieron aquellos *primers* que daban bandas específicas del tamaño esperado y en buena cantidad. Dichos *primers* se resumen en la siguiente **Tabla 9**.

Tabla 9. *Primers* seleccionados después de la primera amplificación. Se asignó un número a cada primer para facilitar el reconocimiento de los mismos durante las tareas laborales.

Numeración	Nombre	Exón	Gen	PCR size (bp)	Tipo de muestra
1	SGK1_e1_1A	1	SGK1	629	Genomic
2	SGK1_e15_1A	15	SGK1	980	Genomic
3	SGK1_e4_1B	4	SGK1	320	Genomic
4	SGK1_e5_2A	5	SGK1	815	Genomic
5	SGK1_e6_1A	6	SGK1	290	Genomic
6	TAP1_e1_1A+1A	1	TAP1	778	Genomic
7	TAP1_e1_1A+1	1	TAP1	810	Genomic
8	SGK1_cDNA_1A	1-2	SGK1	953	cDNA
9	SGK1_cDNA_2A	8-9	SGK1	708	cDNA
10	TAP1_cDNA_1B	1-2	TAP1	830	cDNA
11	TAP1_cDNA_2B	6-7	TAP1	818	cDNA

Se realizó un procedimiento muy parecido con los primers de fragmentos de cDNA; en este caso se utilizaron muestras de cDNA ya disponibles en el laboratorio: preparados de ARN de tonsila y ganglio mediastínico de cerdos comerciales. A continuación, se realizó el mismo protocolo que el detallado en los apartados “Protocolo PCR” (pág. 19) y “Comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa” (pág. 20).

Una vez se comprobó la funcionalidad de los primers, se procedió a realizar el mismo proceso, pero utilizando muestras de cDNA de tonsila y de ganglio mediastínico que había disponibles en el laboraotrio. En la Figura 3 del apartado Resultados (pág. 28) se observa un ejemplo de los resultados obtenidos.

Finalmente, se decidió descartar también el primer 8 (SGK1_cDNA_1A) ya que no resultó funcional al realizar un segundo protocolo de comprobación.

Fase 3: Identificación de polimorfismos

Los fragmentos amplificados que se visualizaban claramente en forma de banda en la comprobación mediante gel de agarosa, se purificaron y a continuación se secuenciaron para poder visualizar la existencia de polimorfismos en las muestras estudiadas.

Purificación de muestras y secuenciación

Los fragmentos amplificados se purificaron siguiendo el protocolo para limpieza de muestras de PCR del kit NZYGelpure 200 columns (nzytech, genes & enzymes):

1. En primer lugar se transfirió el volumen de muestra restante de la visualización en gel de agarosa (20 μ L) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con filtro de NZYTech.
2. Se añadieron 5 volúmenes de *Binding buffer* (100 μ L) y se centrifugó brevemente a temperatura ambiente. Luego se desechó el líquido restante.
3. Se añadieron 600 μ L de *Washing buffer* y se centrifugó durante 1 minuto a temperatura ambiente. De nuevo, se desechó el líquido restante.
4. Se centrifugó de nuevo “en seco” y se desecharon los residuos restantes de la columna.
5. Se añadieron 50 μ L de *Elution Buffer* y se dejó incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 1 minuto y se colocó el líquido sobrante (ADN purificado) en un tubo Eppendorf® de 1,5 μ L mientras que se desechó el filtro de la columna.
6. Se almacenaron las muestras en un congelador a -20°C hasta su uso.

Una vez purificados, las muestras de los fragmentos amplificados se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (versión 3.1, Applied Biosystems) y la reacción de secuenciación fue resuelta en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher) en el servicio de secuenciación de Stabvida (<https://www.stabvida.com/>).

Identificación de polimorfismos

Las secuencias obtenidas se alinearon mediante el software ChromasPro 2.1.8 de la empresa Technelysium (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>). Los polimorfismos encontrados se resumen en el apartado “5.1.3. Descripción de polimorfismos” (pág. 29) de los resultados.

Fase 4. Genotipado de los polimorfismos seleccionados en el biobanco de 382 cerdas caracterizadas para la respuesta a PRRSv.

Diseño de *primers*

De la misma forma que se realizó en el apartado “Diseño de *primers*” de la Fase 2 (pág. 17), se llevó a cabo el diseño de nuevos *primers* utilizando el programa Primer 3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Se introdujeron zonas de los fragmentos amplificados de los genes *TAP1* y *SGK1* donde se encontraban polimorfismos. Se indicó el nucleótido con el polimorfismo como diana y se limitó la medida de los *primers* obtenidos a 60-120 bp. Se seleccionaron 2 *primers* (una opción A y una opción B) para cada fragmento analizado que se recogen en la **Tabla 10**. Los primers fueron fabricados por la empresa Sigma-Aldrich®. Cada set de *primers* está constituido por un primer Forward (F) y un primer Reverse (R).

Tabla 10. *Primers* diseñados en la tercera fase del estudio en base a las mutaciones halladas durante el genotipado. Se asignó un número a cada primer para facilitar el reconocimiento de los mismos durante las tareas laboratoriales.

	Nombre	Secuencia	Mutación en el fragmento	Exón	Gen	Transcrito	PCR size (bp)
1	SGK1_e3_F1A	TGTTGCTCCTCGTGGACTTC	M*	3	SGK1	201	101
	SGK1_e3_R1A	GTGTCCTGCAAGTGTCACATTG					
2	SGK1_e3_F1B	CCTGTTGCTCCTCGTGGAC	M*	3	SGK1	201	99
	SGK1_e3_R1B	CCTGCAAGTGTCACATTGATGC					
3	SGK1_e3_F2A	TTATCCTGCCTTCCACTGTGG	G*	3	SGK1	201	78
	SGK1_e3_R2A	ACCCCTGGCCTCTGTCTTG					
4	TAP1_e4_FA	GCCTCTTGCTGTGGTACCTC	R*	4	TAP1	201	110

4	TAP1_e4_RA	AAGGAAAAGCAGTGGCAAGG	R*	4	TAP1	201	110
5	TAP1_e4_FB	CGGGGACTGTGTCTCTTAGG	R*	4	TAP1	201	93
	TAP1_e4_RB	AGGCAGAAGGAAAAGCAGTG					
6	TAP1_e5_FA	CGGAGCTTTGCCAATGAAGAG	R*	5	TAP1	201	70
	TAP1_e5_RA	TGAGTGTCTTCATGTCCTGCAG					
7	TAP1_e5_FB	TGTCAGCTATGCCTACTGTCC	R*	5	TAP1	201	101
	TAP1_e5_RB	CTCCTTCTGGTTGAGTGTCTTC					

* M: amino (cambio de adenina por citosina); G:guanina; R: purina, cambio de adenina por guanina. Fuente: *Nomenclatura IUPAC*

De la misma forma que en el apartado “Protocolo PCR” de la Fase 2, se comprobó el funcionamiento de los *primers* mediante la amplificación por qPCR de 3 muestras aleatorias de las seleccionadas en el apartado “4.2.3. Procesado del material genético” (pág. 12) y un control negativo, con el protocolo que se muestra en el apartado siguiente.

Como resultado, se seleccionaron los dos *primers* que obtuvieron mejores resultados (**Tabla 11**).

Tabla 11. Primers seleccionados para el genotipado (Fase 4). *El fragmento SGK1_e3_1 fue nombrado SGK1_M6 y el fragmento TAP1_e5_A fue nombrado TAP1_M3.

Nombre	Mutación	Exón	Gen	Transcrito	PCR size (bp)
SGK1_P1	M*	3	SGK1	SGK1-201	101
TAP1_M3	R*	5	TAP1	TAP1-201	70

* M: amino (cambio de adenina por citosina); R: purina, cambio de adenina por guanina. Fuente: *Nomenclatura IUPAC*

Preparación qPCR

El genotipado de los polimorfismos identificados se realizó mediante protocolos de qPCR-HRM (high resolution melting) en muestras de ADN genómico ya disponibles en el laboratorio del grupo.

La qPCR o PCR a tiempo real, es una modificación de la PCR convencional a la que se adiciona un reactivo fluorescente con afinidad por la doble cadena de ADN, esto permite medir la tasa de

generación de un determinado producto gracias a un termociclador con sensores de fluorescencia. El reactivo utilizado fue Evagreen.

El primer paso para realizar la qPCR es la preparación de la *Master mix* (**Tabla 12**) en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL. A continuación, se dispensaron en 4 microplacas de 96 pocillos, 0,5 µL de ADN de las muestras de las 382 cerdas mediante el uso de una pipeta multicanal electrónica. Después, se dispensaron 5 µL de la *Master mix* comentada anteriormente en cada uno de los pocillos.

Tabla 12. Componentes de la *Master mix* preparada para realizar la qPCR.

Reactivo	Volumen x1
Luminaris Color HRM <i>Master Mix</i> x2	2,5 µL
H ₂ O	2 µL
Primer mix 4 µM	0.5 µL
TOTAL	5 µL

Tras la amplificación de los fragmentos mediante PCR, se realiza un lento aumento de la temperatura de la muestra de 60 a 95°C. Mediante la utilización de un equipo de PCR a tiempo real es posible observar a qué temperatura se desnaturaliza la doble cadena de ADN del fragmento amplificado, ya que se producirá un descenso súbito de la fluorescencia emitida por Evagreen.

Un software específico permite detectar diferencias de <0.4°C entre los puntos de desnaturalización. Este hecho permite separar secuencias que difieren en un solo nucleótido (el polimorfismo seleccionado) tanto en homocigosis como en heterocigosis.

A continuación se utilizó el software High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied Biosystems™ y se observaron las distintas curvas obtenidas por las distintas muestras homocigotas y heterocigotas, posteriormente estas se marcaron manualmente como “AA”, “AB” o “BB” tal y como se puede ver en las figuras 4 y 5. El alelo B corresponde al nucleótido que necesita más energía para disociarse en una doble cadena de ADN (C para el polimorfismo del *SGKI* y G para la mutación de *TAP1*; **Tabla 11**).

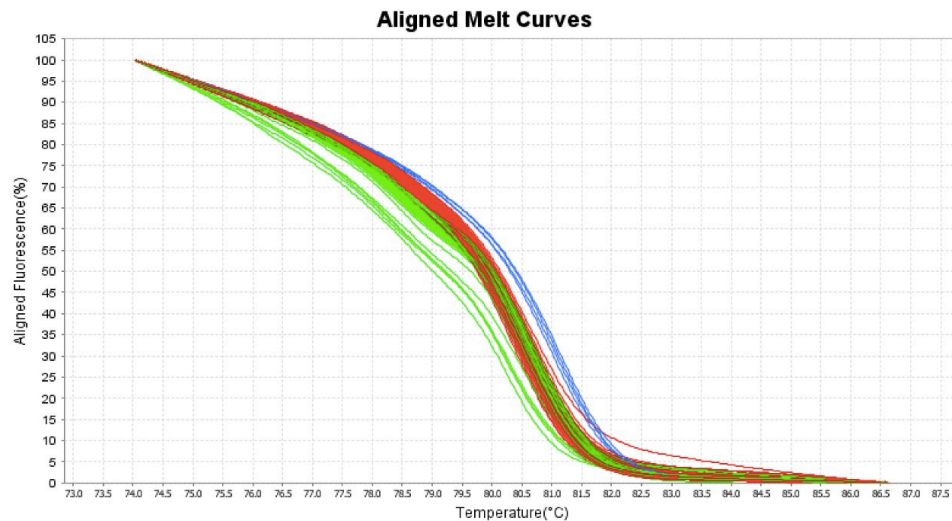


Figura 4. Ejemplo de curvas alineadas obtenidas mediante High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied BiosystemsTM del primer 6 del gen *TAP1*. Las muestras de animales “AA” se observan en rojo, las muestras de los animales “AB” en verde y las muestras de los animales “BB” en azul.

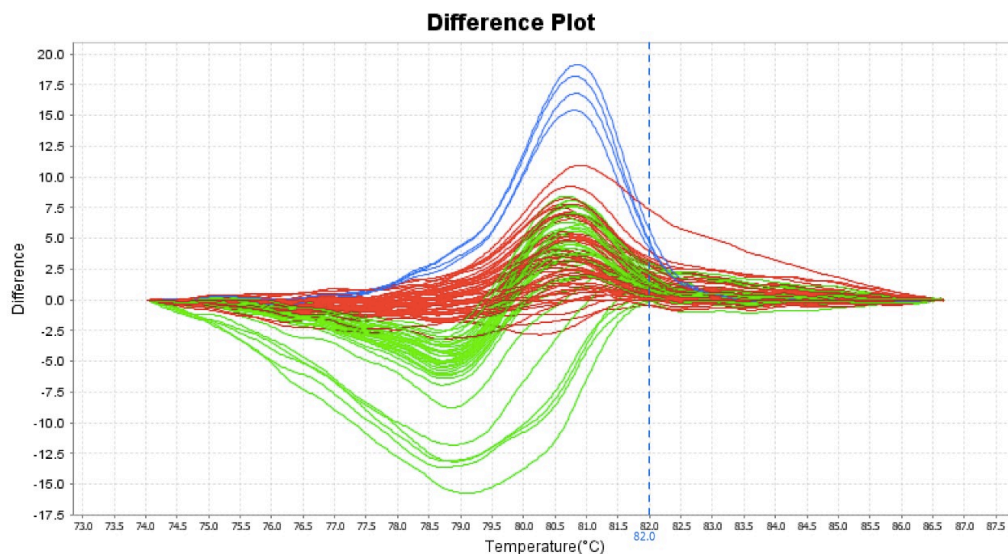


Figura 5. Ejemplo de gráfico “Difference Plot” obtenido mediante High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied BiosystemsTM del primer 6 del gen *TAP1*. Las muestras de animales “AA” se observan en rojo, las muestras de los animales “AB” en verde y las muestras de los animales “BB” en azul.

Análisis estadístico de los datos

Se realizó un estudio de regresión logística (model logit) para estudiar la asociación del genotipo con la clasificación (0/1) de respuesta virémica y de la presencia o ausencia de anticuerpos frente la vacuna con PRRSv para caracterizar el fenotipo (Abella et al. 2019).

La asociación entre los datos genotípicos y productivos se analizó mediante un modelo mixto que incluía, como efectos fijos, el efecto del lote de vacunación (4 niveles), el orden de parto (4 niveles: 1er, 2º, 3º y 4º o posterior), la situación (endémica/epidémica) de PRRS en la granja, y el genotipo individualmente para cada marcador, y como efectos aleatorios, la cerda y la madre. Los parámetros reproductivos estudiados fueron: NT (NV+NM), NTM (NT+MM), NV, NM, MM, NLP (NM+MM), NLP/NTM que se han valorado uno a uno. Finalmente, también se utilizó un test de Student para comparar las medias de cada genotipo para cada carácter. El umbral de significación se fijó a $P < 0,05$.

5. Resultados y análisis estadístico

5.1. Amplificación de los genes *SGK1* y *TAP1*

5.1.1. Optimización de PCRs

Como resultado de la comprobación del funcionamiento de los distintos *Primers* diseñados, se obtuvieron bandas como por ejemplo las de las figuras 2 y 3. Se decidió utilizar unos *primers* u otros a partir de la presencia de las distintas bandas y de su nitidez, de la correspondencia con el tamaño esperado de la PCR y de la especificidad de la banda, todos indicadores de que el fragmento de ADN deseado ha sido amplificado correctamente.

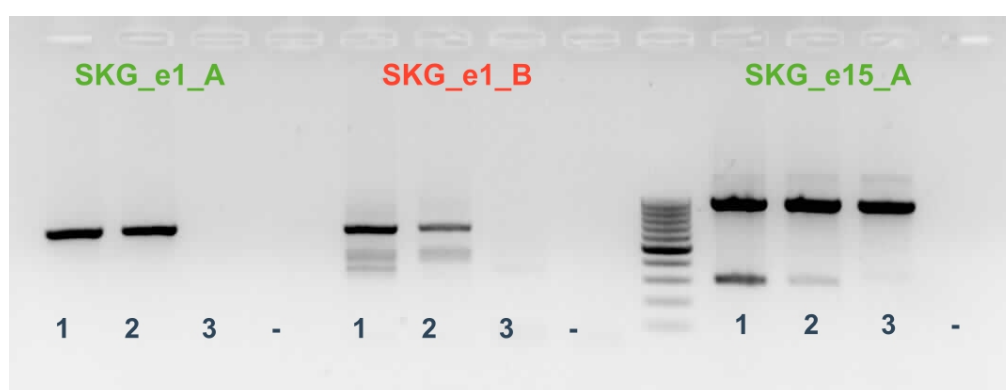


Figura 2. Fotografía obtenida después de la exposición del gel de agarosa a una cámara de rayos UV. Los *primers* seleccionados aparecen en color verde, los *primers* descartados en color rojo. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las muestras elegidas aleatoriamente y “-” hace referencia al control negativo.



Figura 3. Fotografía obtenida después de la exposición del gel de agarosa a una cámara de rayos UV. Los *primers* seleccionados aparecen en color verde, los *primers* descartados en color rojo. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las muestras elegidas aleatoriamente y “-” hace referencia al control negativo.

Los *primers* finalmente seleccionados se detallan en la **Tabla 7** (pág. 17).

5.1.2. Amplificación en madres R y S

Los resultados de la segunda PCR realizada en la fase 2 sobre 32 muestras (16 de cerdas resistentes y 16 de cerdas sensibles) se comprobaron en geles de agarosa obtuviéndose bandas como por ejemplo las de la Figura 6. En los pocillos que no se visualiza banda significa que la reacción de amplificación no ha funcionado y por lo tanto esas muestras no se purificaron para la secuenciación.

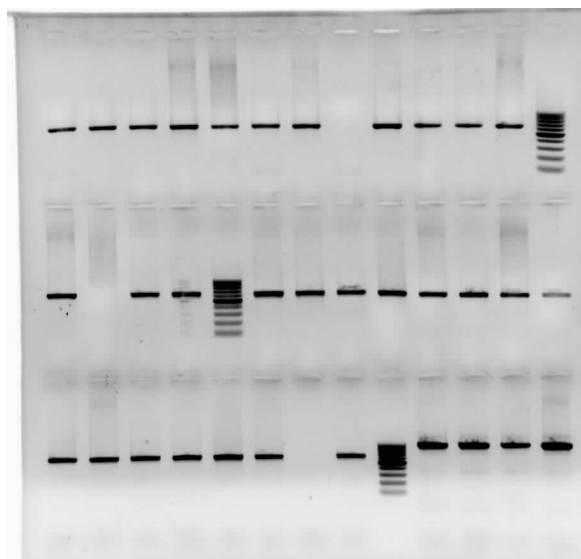


Figura 6. Ejemplo de la visualización de bandas en gel de agarosa obtenidas mediante electroforesis de los *primers* 1 y 2. Los primeros 32 pocillos (sin contar el marcador de peso molecular) corresponden al *Primer 1* y los 4 finales corresponden al *Primer 2*.

5.1.3. Descripción de polimorfismos

Durante el alineamiento de las secuencias obtenidas se identificaron varios polimorfismos en las regiones transcritas de estos genes.

En el caso del gen *SGK1*, se encontraron 12 polimorfismos, 10 de ellos tipo SNP (cambio de una sola base) y dos inserciones de un único nucleótido. La mayoría de estas mutaciones se hallaron en las regiones 5' y 3' no codificantes por lo que no afectan a la secuencia de la proteína. La mutaciones de estas zonas pueden ser silenciosas (es decir, sin consecuencias en la funcionalidad del gen) pero a menudo tienen un efecto sobre la estabilidad del ARNm y por tanto, sobre su eficiencia de traducción. Esto resulta en modulaciones de la cantidad de proteína activa sintetizada por el gen. Uno de los SNPs se encuentra situado en el primer exón del transcrito 205.

Esta variante se forma usando el exón 5 como primer exón, que tiene una parte 5' no codificante, más una parte codificante que se inicia con el codón ATG. Este SNP cambia la secuencia de la proteína; concretamente, la Prolina en posición 19 muta a Serina. Esto supone un cambio de aminoácido no polar a polar.

Un estudio del posible impacto que podría tener la mutación P19S en la proteína con el software SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <https://sift.bii.a-star.edu.sg>) da una alta probabilidad que esta mutación sea mal tolerada por la proteína, es decir, que su funcionalidad se vea afectada.

Tabla 13. Resumen de las mutaciones halladas en el gen *SKG1* mediante qPCR-HRM.

Marcador	Mutación	Tipo de polimorfismo	Localización	Efecto en el gen	Selección para genotipado
M1	c.-360C>T	SNP	Exón 1	5'UTR	
M2	c.-342A>G	SNP	Exón 1	5'UTR	
M3	c.*8C>T	SNP	Exón 15	3'UTR	
M4	c.*269insG	indel	Exón 15	3'UTR	Sí
M5	c.*350G>A	SNP	Exón 15	3'UTR	
M6	c.*512C>A	SNP	Exón 15	3'UTR	Sí
M7	c.-660insA	indel	Exón 5 (v205)	5'UTR	
M8	c.-600G>T	SNP	Exón 5 (v205)	5'UTR	
M9	c.-485C>T	SNP	Exón 5 (v205)	5'UTR	
M10	c.-441C>T	SNP	Exón 5 (v205)	5'UTR	
M11	c.-435C>T	SNP	Exón 5 (v205)	5'UTR	
M12	c.+55C>T	SNP	Exón 5 (v205)	Missense. CCCTCC → TCC P19S	

En el caso del gen *TAPI* se identificaron 9 polimorfismos tipo SNP, todos en la región codificante. La mayoría de estos SNPs eran sinónimos, es decir, no cambiaban la secuencia de la proteína. Sin embargo, dos mutaciones en el exón 10 provocaban dos cambios aminoacídicos. La posible consecuencia funcional de estas dos mutaciones fueron estudiadas con el programa SIFT, confirmando la poca tolerancia funcional de estos cambios. De hecho, en ambos casos hay un cambio en la polaridad del aminoácido, de no-polar a polar en el cambio L669Q, y de polar a no-polar en el Q674P.

Tabla 14. Resumen de las mutaciones halladas en el gen *TAP1* mediante qPCR-HRM.

Marcador	Mutación	Tipo de polimorfismo	Localización	Efecto en el gen	Selección para genotipado
M1	c.+729G>A	SNP	Exon 3	<i>Synonymous</i> GGG/GGA G243	
M2	c.+942G>A	SNP	Exon 4	<i>Synonymous</i> GGG/GGA G314	Sí
M3	c.+1185G>A	SNP	Exon 5	<i>Synonymous</i> AAG/AAA K385	Sí
M4	c.+1692C>G	SNP	Exon 8	<i>Synonymous</i> CCC/CCG P564	
M5	c.+1791T>C	SNP	Exon 9	<i>Synonymous</i> TAT/TAC Y597	
M6	c.+1833C>T	SNP	Exon 9	<i>Synonymous</i> GCC/GCT A611	
M7	c.+1984C>T	SNP	Exon 10	<i>Synonymous</i> CTG/TTC L662	
M8	c.+2006T>A	SNP	Exon 10	<i>Missense</i> CTG/CAG L669Q	
M9	c.+2021A>C	SNP	Exon 10	<i>Missense</i> CAA/CCA Q674P	

Tras analizar estos resultados, se decidió intentar genotipar por qPCR-HRM 4 mutaciones (2 del gen *SGK1* y 2 del gen *TAP1*). Una vez recibidos los primers y comprobada la facilidad de detección de los perfiles HRM diagnósticos, se escogieron los marcadores SGK_M6 y TAP1_M3 para genotipar toda la población de referencia disponible en el laboratorio.

5.2. Genotipado de las mutaciones SGK1_M6 y TAP1_M3

5.2.1. Cálculo de las frecuencias génicas y equilibrio HW

Las frecuencias de los distintos genotipos se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 15. Frecuencias génicas calculadas mediante las siguientes fórmulas: $\text{Freq (A)} = (2x(n) \text{ AA} + 1x(n) \text{ AB}) / 2x(\text{AA} + \text{AB} + \text{BB})$; $\text{Freq (B)} = 1 - \text{Freq (A)}$. Donde n = número. MAF (allele) hace referencia a la frecuencia del alelo menor (A) y el alelo alternativo se refiere con B.

Marcador	Gen	MAF (allele)*	Frecuencias genotípicas
SGK1_M6	SGKI	0.49 (A)	AA: 100, AC: 103, CC: 109
TAP1_M3	TAPI	0,38 (G)	AA: 152, AG: 118, GG: 44

Las frecuencias de ambos marcadores son intermedias, es decir, no extremas. Este dato tiene interés en su aplicación, por ejemplo, en esquemas de selección, puesto que la mayor respuesta genética se obtiene con frecuencias génicas intermedias.

La desviación de las frecuencias de Hardy-Weinberg aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 16. Cálculo de las frecuencias HW de los marcadores estudiados. Fuente: Software OEGE.

Marker	Gene	HW
SGK1_M6	SGKI	$X^2 = 199.33$
TAP1_M3	TAPI	$X^2 = 42.68$

Dado que los valores de chi cuadrado han sido $> 3,48$ se puede afirmar que la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg para ninguno de los marcadores estudiados. Esto probablemente es debido al hecho de que estas hembras son todas cruzadas de dos líneas comerciales de distinta raza o base genética. Estas razas seguramente tienen frecuencias génicas distintas para estos marcadores. En el cruce de animales F1, se pierde el equilibrio y se necesitaría una segunda generación (de cruce entre F1) para volver a alcanzar este equilibrio. Dada esta circunstancia, la falta de equilibrio y las frecuencias obtenidas no aportan ninguna información sobre si estos alelos han sido seleccionados en favor o en contra en las líneas puras.

5.2.2. Estudio de asociación y clasificación R/S

En la siguiente tabla se resumen el número de cerdas que se clasificaron como 0 o 1 tal y como se explicó en el apartado “4.2.1. Origen de los animales estudiados y fenotipado de la resistencia al PRRSv” (pág. 10) según su título de virus en sangre (PCR) y los anticuerpos presentes (ELISA). Como se puede observar, de los animales que no desarrollan viremia tras la vacunación (PCR = 0) aproximadamente la mitad tampoco desarrollan anticuerpos (o el título está por debajo del nivel de detección de la técnica ELISA). En cambio, prácticamente la totalidad de las cerdas con viremia positiva desarrollan también anticuerpos.

Tabla 17. Cantidad de cerdas clasificadas como 0 o 1 según la presencia de virus en sangre a día 7 y 21 post vacunación (1 animales positivos, 0 animales negativos al virus) y según el título de anticuerpos contra PRRSv a día 42 post vacunación.

		Clasificación PCR		
		0	1	Todos
Clasificación AC	0	54	5	59
	1	51	188	239
	Todos	105	193	298

A continuación, mediante el uso del software *JMP* de análisis estadístico, se valoró el efecto de la clasificación PCR y AC en relación a los distintos alelos mediante la medida del odds ratio.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 18. Resultados obtenidos del efecto de los marcadores estudiados sobre la clasificación por virus y para la clasificación por anticuerpos.

Odds Ratio (Prob chi ²)	Clasificación PCR (Virus)	Clasificación ELISA (Anticuerpos)
SGK1_M6	0,0803	0,0267*
TAP1_M3	0,2032	0,3425

En ella se puede observar que hay una relación significativa entre el genotipo SGK_M6 y la clasificación por respuesta a anticuerpos. La relación con la clasificación por PCR, que de

acuerdo con Abella et al. (2019) determina el fenotipo resistente/sensible, se encuentra muy cerca del límite de significación.

Se estudió también la ratio de probabilidades (*Odds ratio*) en relación a las dos clasificaciones según el genotipo de las cerdas. Se ha observado que el *Odds ratio* de la presencia del fragmento SGK1_M6 para la clasificación por anticuerpos y el *Odds ratio* de la presencia del fragmento TAP1_M3 para la clasificación por títulos víricos en sangre tienden a la significación.

Tabla 19. *Odds ratio* del marcador SGK1_M6 en cuanto a clasificación PCR (viremia 0 respecto a 1).

Nivel 1	Nivel 2	<i>Odds Ratio</i>	Prob>Chi cuadrado
CA	AA	1,9163285	0,0349*
CC	AA	1,6904755	0,0869
CC	CA	0,8821429	0,6654

Tabla 20. *Odds ratio* del marcador SGK1_M6 en cuanto a clasificación ELISA (Anticuerpos; clasificación 0 respecto a 1).

Nivel 1	Nivel 2	<i>Odds Ratio</i>	Prob>Chi cuadrado
CA	AA	2,5703611	0,0175*
CC	AA	2,4055944	0,0267*
CC	CA	0,9358974	0,8416

En cuanto al *Odds ratio* del marcador SGK1_M6 para la clasificación de PRRSv en sangre, se ha visto que es 1,92 veces más probable que un animal no presente PRRSv en sangre si tiene el genotipo “CA” que si tiene el genotipo “AA” ($P = 0,03$) tras la aplicación por parte de Abella et al. (2019) de una vacuna viva atenuada de este virus.

En el estudio del *Odds ratio* del marcador SGK1_M6 para la clasificación de anticuerpos, se ha visto que es 2,57 veces más probable que un animal no presente anticuerpos contra PRRSv si es CA que si es AA ($\text{Prob}>\chi^2 = 0,0175$) tras la aplicación por parte de Abella et al. (2019) de una vacuna viva atenuada de este virus; y es 2,4 veces más probable que no presente anticuerpos contra PRRSv si presenta el genotipo CC que si presenta el genotipo AA ($\text{Prob}>\chi^2 = 0,0267$) tras la aplicación de la misma vacuna. Ambas hipótesis tienen son significativas.

En su conjunto estos resultados nos indican que las cerdas de genotipo AA tienen más probabilidad de desarrollar viremia y anticuerpos ante un desafío con el virus atenuado de PRRSv que el resto de genotipos. Es decir, son menos capaces de controlar la replicación del virus una vez expuestas a él. Este efecto parece ser puramente recesivo ya que se necesitan dos alelos A para observar un cambio en las *Odds ratios*.

En cuanto al estudio del *Odds ratio* sobre el marcador TAP1_M3, no se establecieron relaciones significativas tanto para la clasificación ELISA (Anticuerpos) como para la clasificación PCR (virus), por lo que no se exploraron los Odds ratios de estos genotipos.

5.2.3. Estudio de asociación de los marcadores SGK1 y TAP1 con caracteres reproductivos

Los resultados del análisis de asociación con los datos reproductivos se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 21: Resumen del análisis de asociación entre caracteres reproductivos y cada uno de los marcadores estudiados (SGK1_M6 y TAP1_M3).

	SGK1_M6 (Significación)	Prob > F	TAP1_M3 (Significación)	Prob > F
NT (NV+NM)	tendencia	0,0638	no	0,7780
NTM (NT+MM)	tendencia	0,0630	no	0,8608
NV	sí	0,0324	no	0,4999
NM	no	0,6733	no	0,6456
MM	no	0,4818	sí	0,0457
NLP (NM + MM)	no	0,4576	no	0,4729
Mt (NLP/NT)	no	0,2433	no	0,5749

Con el objetivo de valorar otros efectos que también pueden influir en los datos reproductivos (además de los marcadores moleculares), se analizaron el resto de variables fijas de este estudio (Lote, Paridad, Clasificación PCR, Clasificación AC y Título final de PRRSv) para obtener su coeficiente de determinación (R cuadrado). Los hallazgos de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 22. Resultado del análisis de asociación de las variantes (Y) respecto a los efectos fijos (X): Lote, Paridad, Clasificación PCR, Clasificación Ac y Título final. Valores de R cuadrado.

	Lote	Paridad	Clasificación PCR	Clasificación AC	Título final
NT (NV+NM)	0,012	0,052	0,004	0,001	0,053
NTM (NT+MM)	0,013	0,067	0,006	0,002	0,065
NV	0,006	0,021	0,001	~ 0	0,034
NM	0,014	0,050	0,050	0,005	0,057
MM	0,002	0,032	0,004	0,003	0,036
NLP (NM + MM)	0,015	0,067	0,007	0,006	0,060
Mt (NLP/NT)	0,075	0,040	0,006	0,004	0,042

Aunque este estudio se centra en el efecto de los marcadores SGK1_M6 y TAP1_M3, los valores R indicados en la Tabla 22 indican que la asociación entre el resto de efectos fijos y los datos reproductivos recopilados es fuerte ($P < 0,05$).

Por otro lado, con los valores mínimos cuadrados obtenidos de los marcadores SGK1_M6 y TAP1_M3, se realizó una comparación de medidas mediante una prueba T Student para cada marcador. Los parámetros que han presentado relaciones significativas se muestran a continuación:

Tabla 23. Resumen de los resultados significativos extraídos de la comparación de mínimos cuadrados según el genotipo de los marcadores SGK1_M6 y TAP1_M3. EE = Error estándar. Dentro de cada marcador y carácter, los distintos superíndices indican diferencias significativas entre las medias ($P < 0,05$).

		AA \pm EE	AC \pm EE	CC \pm EE
SGK1_M6	NT (NV+NM)	12,86 ^a \pm 0,28	13,56 ^a \pm 0,28	13,516 ^b \pm 0,28
	NTM (NT+MM)	13,36 ^a \pm 0,29	14,04 ^a \pm 0,29	14,07 ^b \pm 0,29
	NV	11,06 ^a \pm 0,24	11,82 ^{ab} \pm 0,25	11,62 ^b \pm 0,25
		AG \pm EE	AG \pm EE	GG \pm EE
TAP1_M3	MM	0,55 ^a \pm 0,05	0,48 ^{ab} \pm 0,04	0,39 ^b \pm 0,06

En cuanto a los resultados del análisis de la T student se estableció que:

- Para el marcador SGK1_M6, el número de nacidos totales (NT) es significativamente más bajo en las cerdas con genotipo AA ($p < 0,05$) que en las cerdas de genotipos AC y CC. Tal y como se aprecia en la Figura 7; esta diferencia se remarca particularmente en momentos de brote del virus en la explotación. Por otro lado, los genotipos AC y CC no se diferencian en número total de lechones por parto.

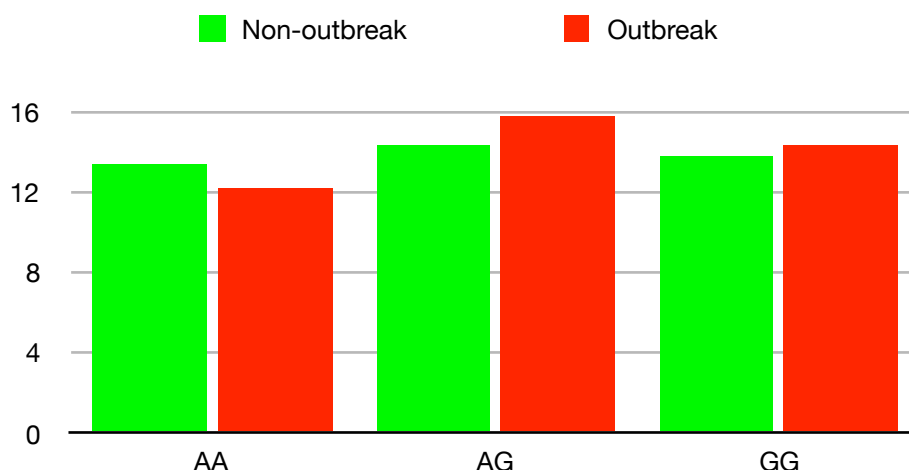


Figura 7. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a lechones nacidos totales del marcador SGK1_M6.

- En este mismo marcador, también se han encontrado las mismas diferencias cercanas a la significación ($p < 0,05$) en cuanto al parámetro NTM: las cerdas con genotipo AA dieron a luz menos lechones totales (NTM), siendo esta diferencia más acentuada en periodos de brote de la enfermedad (tal y como se indica en la Figura 8), que las cerdas de otros genotipos.

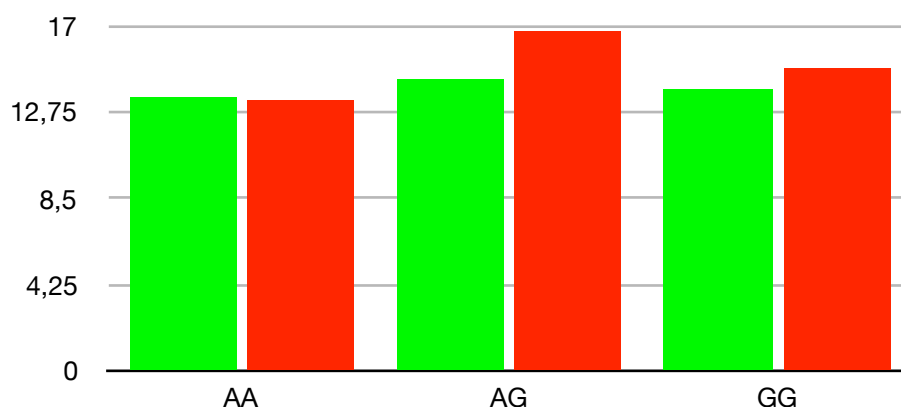


Figura 8. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a nacidos totales muertos del marcador SGK1_M6.

- En el marcador SGK1_M6 las cerdas con genotipo AA presentaron un menor número de nacidos vivos (especialmente en fases de brote de la enfermedad) que las cerdas heterocigotas (CA) ($p < 0,05$). Las diferencias entre los grupos de cerdas AA y CC no llegan a ser significativas pese a observarse una tendencia con $p < 0,06$.

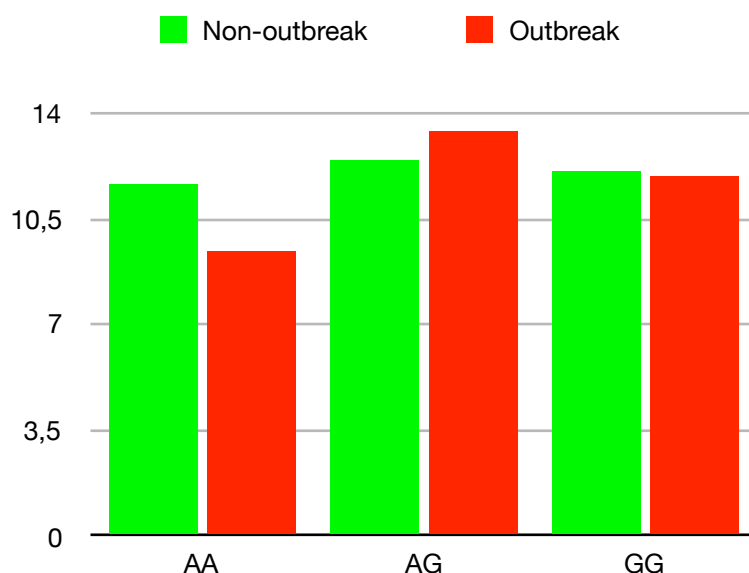


Figura 9. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: en verde, o brote de PRRS: en rojo) en cuanto a nacidos vivos para el marcador SGK1_M6.

De nuevo se observa la recesividad del alelo A de este marcador, puesto que los heterocigotos y los homocigotos alternativos no difieren en las medias.

- En cuanto al macador TAP1_M3, se hallaron diferencias significativas de fenotipo entre las cerdas de genotipo AA y las cerdas de genotipo GG en cuanto a lechones nacidos momificados. Las cerdas GA mostraron un fenotipo intermedio, no diferente de ninguno de los dos homocigotos pero que podría indicar un efecto aditivo del alelo A. Este efecto es muy llamativo cuando se separan los datos según si las cerdas están en situación endémica o en brote epidémico de la enfermedad (Figura 10). Durante la fase endémica de la enfermedad, todas las hembras tienen el mismo número de lechones modificados: entorno a 1 lechón momificado por cada 10 partos, independientemente de su genotipo TAP1_M3. En cambio, durante el brote epidémico, aumenta el número de lechones momificados particularmente en las cerdas AA, con más de un momificado por parto.

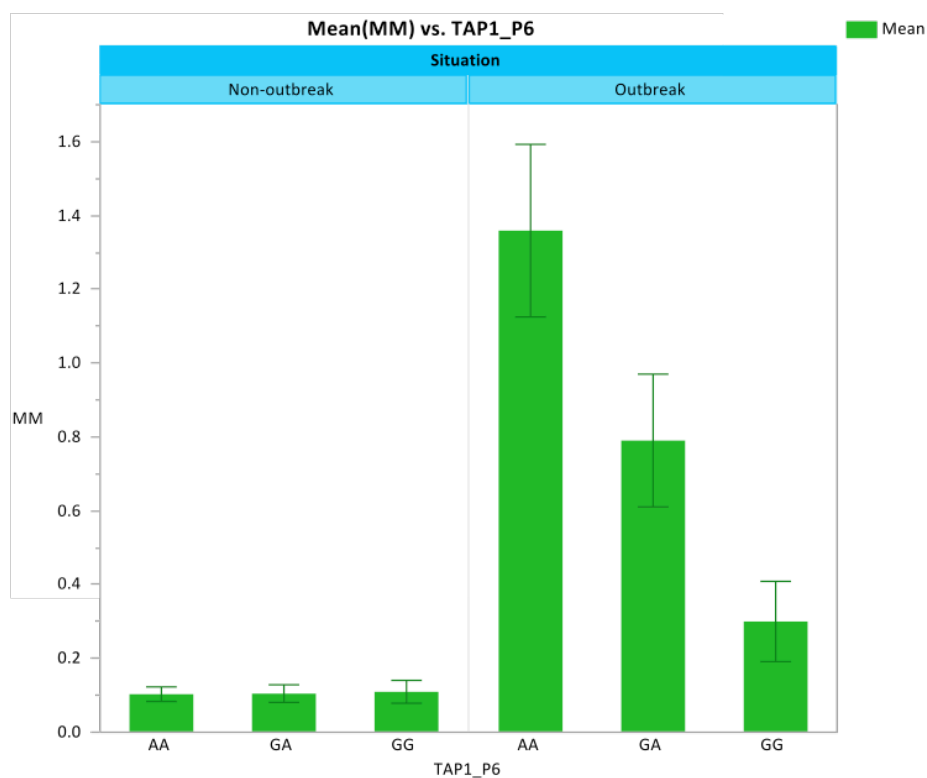


Figura 10. Comparación de la situación del virus en la explotación (endémica: izquierda o brote de PRRS: derecha) en cuanto a lechones momificados del marcador TAP1_M3.

En el resto de parámetros no se observaron asociaciones significativas del marcador con los caracteres reproductivos, ni diferencias entre medias en la prueba de la T de Student.

6. Discusión

Los polimorfismos hallados en los fragmentos analizados del gen *SGKI* (marcador SGK1_M6) dan lugar a fenotipos significativamente distintos en cuanto a la presencia del virus en sangre (Clasificación PCR) y en cuanto a presencia de anticuerpos en respuesta al PRRSv (Clasificación AC).

Estos resultados confirman lo hallado en la literatura: que el gen *SGKI* tiene un papel importante en la inmunidad animal (Salker et al., 2011). Probablemente se deba a que, tal y como confirmaron Heinkab et al. (2013) tiene un papel determinante en el desarrollo de las células T.

Este polimorfismo también se ha relacionado de forma significativa con el número de lechones nacidos por parto, específicamente con el número de nacidos vivos pero no con el número de nacidos muertos. Este hallazgo también coincide con el de distintos autores que también relacionaron este gen *SGKI* con la implantación y la supervivencia embrionaria (Salker et al., 2011; Salker et al., 2016). Es decir, la muerte embrionaria se da seguramente en el periodo pre-implantacional y los embriones (o conceptus) son reabsorbidos, por lo que no se observan ni nacidos muertos ni momias, pero sí una bajada en la prolificidad y seguramente en la productividad numérica (destetados al final del año) de la cerda.

La relación entre inmunidad y reproducción ha sido ampliamente estudiada. Se conoce que la interrelación en la inmunidad materno-fetal es crítica para el allo-reconocimiento de los embriones durante la implantación. Cabe recordar que tal como se ha presentado en la introducción, este gen ha sido estudiado por localizarse en una región genómica asociada con número de nacidos muertos durante brotes de PRRS (Serão et al. 2014), lo cual contrasta con los resultados presentados en este TFG.

Finalmente, el marcador estudiado del gen *TAPI* se relacionó con los nacidos momificados, presentando un menor número de estos las cerdas con genotipo “GG” que las cerdas con alelo “AA”. Este efecto era especialmente evidente cuando se presentaban los resultados por situación endémica/epidémica de la granja. Estos resultados coinciden con autores previos que afirmaron que este gen tiene un papel importante en la supervivencia embrionaria (Cooper et al., 1998). Cuando la muerte embrionaria ocurre ya en estado de feto, pueden formarse las momias por un proceso de

resecaci n. Este gen codifica para una proteína con un papel muy relevante en la inmunidad adaptativa: la movilización de los antígenos desde el citoplasma a los complejos MHC-I en la superficie celular. *TAP1* y *TAP2* funcionan como un transportador que incorpora los péptidos antigénicos desde el citoplasma al retículo endoplasmático, desde donde van a ser vehiculadores unidos al receptor CD8 hacia el aparato de Golgi y la membrana celular.

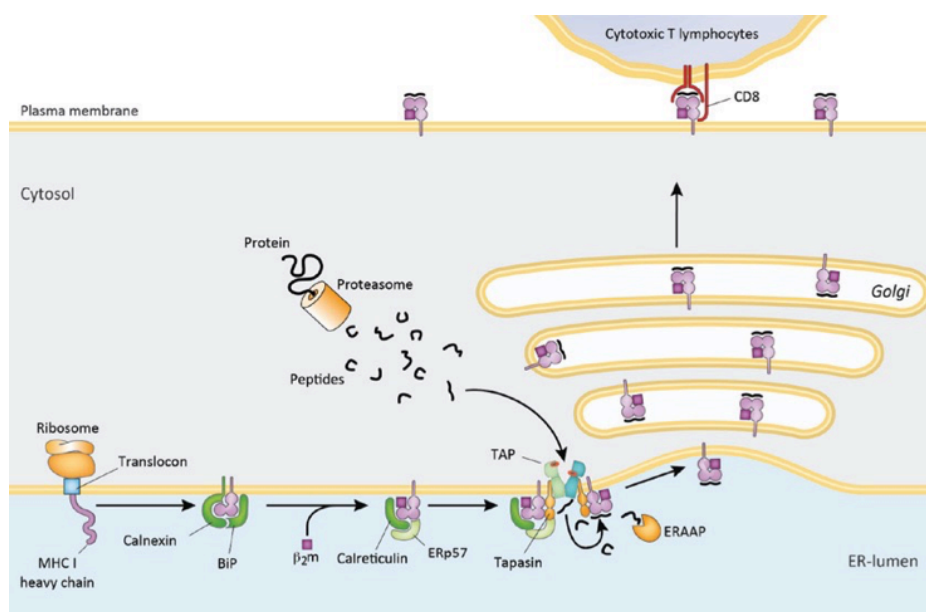


Figura 11. Procesamiento de antígenos mediado por el MHC I: Los péptidos antigénicos, derivados de la degradación de los proteosomas, se translocan desde el citosol hasta el l men del retículo endoplasmático (RE) mediante el transportador heterodimérico TAP1/TAP2 asociado con el procesamiento de antígenos. En el l men del RE se forma un complejo de carga de péptidos que estabiliza tanto las moléculas TAP como el MHC I para hacer más eficiente el proceso. Los complejos péptido-MHC I estables se envían vía el aparato de Golgi a la superficie celular, donde se presentan a linfocitos T citotóxicos (Eggenberger & Tamp , 2015).

Esta función concuerda con la asociación genómica encontrada en el SSC7 con la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, la mutación estudiada no se ha relacionado con la respuesta a anticuerpos sino con los nacidos momificados. Aunque los estudios relacionando esta proteína con la respuesta a PRRSv son pocos, s  que se ha descrito que la expresión de este gen es más elevada en cerdos infectados con PRRSv con alta viremia (Wysocki et al., 2011).

Además de las mutaciones SGK1_M6 y TAP1_M3 genotipadas en este TFG, se han encontrado 11 polimorfismos más en el gen *SGK1* y 8 en el gen *TAP1*, dos de los cuales cambian la secuencia de la proteína. Sería interesante en un futuro completar el genotipado de algunos de los marcadores identificados en este TFG en la población de referencia y también en poblaciones adicionales de validación.

7. Conclusiones y posibilidades de mejora

Dada la confirmación de la influencia de los genes *SGK1* y *TAP1* en características inmunitarias y reproductivas, este trabajo concluye que sería beneficioso implantar selecciones por genotipos en programas de mejora genética si se validan en poblaciones adicionales. Los genotipos a seleccionar son los siguientes:

- Seleccionar en contra del alelo A para el marcador SGK1_M6 del gen *SGK1*, para mejorar la capacidad de controlar un desafío con PRRSv, particularmente durante los brotes epidémicos.
- En base a la anterior afirmación, también sería más conveniente en cuanto a la optimización de las características reproductivas, seleccionar contra el alelo A de este marcador para aumentar los nacidos vivos por parto sobretodo en las etapas de brote de la enfermedad.
- Finalmente, seleccionar a favor del alelo G del para el marcador TAP1_M3 del gen *TAP1*, para reducir el número de lechones nacidos momificados, particularmente durante un brote epidémico de PRRSv.

La optimización de los esquemas de selección porcino en cuanto a resistencia del virus PRRSv ahorraría grandes sumas económicas a la industria porcina ya que permitiría disminuir el uso de vacunas y mejorar ciertos parámetros reproductivos como el aumento del número de lechones nacidos por cada camada o la disminución del número de lechones nacidos momificados.

8. Referencias bibliográficas

- Abella, G., Novell, E., Taracon, V., Varona, L., Pena, R.N., Estany, J., & Fraile, L. (2019). Identification of resilient sows in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus infected farms. *Journal of Animal Science*, *skz192*
- Albella, G., Pena, R.N., Nogareda, C., Armengol, R., Vidal, A., Moradell, L., Taracon, V., Novell, E., Estany, J. & Fraile, L (2016). A WUR SNP is associated with European Porcine Reproductive and Respiratory Virus Syndrome resistance and growth performance in pigs. *Research in Veterinary Science*, (104), 117- 22.
- Boddicker, N. J., Bjorkquist, A., Rowland, R. R., Lunney, J. K., Reecy, J. M., & Dekkers, J. C. (2014). Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Genetics Selection Evolution*, 46, 18. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-18>
- Barranco, I (2011). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome: evaluation of the expression of cytokines and apoptosis phenomena in lymphoid organs and their role in the immune response. Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones: Tesis doctoral.
- Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Deen, J., & Pijoan C. (2002). Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(3), 196-200.
- Bierk, M.D., Dee, S.A., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., & Molitor, T.W. (2001). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 65, 261-266.
- Boddicker, N., Wide, E. H, Rowland, R. R. R, Lunney, J. K, Garrick, D. J, Reecy, J. M, & Dekkers, J. C. M. (2012). Evidence of major QTL associated with host response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus challenge. *Journal of Animal Science*, 90 (6), 1733–1746
- Cooper, J.C., Fernandez, N., Joly, E. & Dealtry, G.B. (1998). Regulation of major histocompatibility complex and TAP gene products in preimplantation mouse stage embryos. *American Journal of Reproductive Immunology* 40:165–171.

- Eggensperger, S., & Tampé, R. (2015). The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biological Chemistry*, 396, 9-10.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F. & Dvorak, A.M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *Journal of Experimental Medicine*, 187, 903-915
- Gol, S., Estany, J., Fraile, L.J. & Pena, R.N. (2015). Expression profiling of the GBP1 gene as a candidate gene for porcine reproductive and respiratory syndrome resistance. *Animal Genetics*, 46(6), 599- 606.
- Gómez-Laguna, J., Rodríguez-Gómez, I.M., Barranco, I., Quereda, J. J., García-Nicolás, O., Ramis, G., Pallarés, F.J, & Carrasco, L. (2011). *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 24(1)
- Halbur, P.G., Rothschild, M.F., Thacker, B. J., Meng, X.J., Paul, P.S., & Bruna, J.D. (1998). Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 115:181–189.
- Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E.J., Zimmerman, J.J., Rotto, H.F., Yoder, T.K., Wang, C., Yeske, P.E., Mowrer C.L. & Haley C.A. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21, 72–84.
- Karniychuk, U. U., & Nauwynck, H. J. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Research*, 44, 95
- Luca, F., S. Kashyap, C. Southard, M. Zou, D. Witonsky, A. Di Rienzo, and S. D. Conzen. 2009. Adaptive variation regulates the expression of the human SGK1 gene in response to stress. *PLoS Genet*. 5:e1000489.
- Nielsen, J., Rønsholt, L., & Sørensen, K. (1991). Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary Microbiology*, 28, 1–11.

- Norton, M., & Screaton, R. A. (2014). SGK1: master and commander of the fate of helper T cells. *Nature Immunology*, 15(5), 411–413.
- Pena, R.N., Fernández, C., Blasco-Felip, M., Fraile, L. & Estany, J (2018). Análisis de marcadores de resiliencia en relación con la tasa de abortos en cerdas. XIX Reunión Nacional de Mejora Genética Animal. 12-13 Junio, León.
- Serão, N. V.L, Martika, O., Kemp, R. A, Harding, J. C.S, Bishop, S.C, Plastow, G.S. & Dekkers, J. C.M. (2014). Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd. *Journal of Animal Science* 92 (7), 2905–2921.
- Salker, M.S., Christian, M., Steel, J.H., Nautiyal, J., Lavery, S., Trew, G., Webster, Z., Al-Sabbagh, M., Puchchakayala, G., Föller, M., Landles, C., Sharkey, A.M., Quenby, S., Aplin, J.D., Regan, L., Lang, F. & Brosens, J.J. (2011) Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. *Nature Medicine* 17, 1509–1513.
- Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. & Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth edition edición). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J. & Nelson, E.A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Veterinary Microbiology*, 55(1-4), 231-40
- Wysocki, M., Chen, H., Steibel, J. P., Kuhar, D., Petry, D., Bates, J., Johnson, R., Ernst, C.W. & Lunney, J. K. (2011). Identifying putative candidate genes and pathways involved in immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Animal Genetics*, 43(3), 328–332.
- Yaeger, M.J., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. & Benfield, D. (1993) Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Journal of Swine Health and Production*, 1: 7-9.

9. Programario

- Ensembl (www.ensembl.org/)
- Chromas Pro (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>)
- Primer 3 Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>)
- Códigos IUPAC (<https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>)
- High Resolution Melt Software v3.0.1 de Applied Biosystems™
- JMP Software estadístico